

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. September 2005 (29.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/090394 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 14/21, C12P 13/02

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OSSWALD, Stefan [DE/DE]; Landwehrstrasse 33, 63517 Rodenbach (DE). WECKBECKER, Christoph [DE/DE]; August-Imhof-Strasse 25, 63584 Gründau (DE). HUTHMACHER, Klaus [DE/DE]; Lärchenweg 18, 63571 Gelnhausen (DE). GERASIMOVA, Tatjana [RU/RU]; Podolskikh Kursantov, 18/1, fl. 626, Moscow, 117545 (RU). NOVIKOV, Andrey [RU/RU]; Kransnopresnenskaya nab., 1/2, fl. 107, Moscow, 123610 (RU). RYABCHENKO, Ludmila [RU/RU]; Moscow region, Mozajskoe sh., 113, Odintcovo, 14311 (RU). YANENKO, Alexander [RU/RU]; Kutuzovsky pr., 33, fl. 135, Moscow, 12193 (RU). EGOROVA, Ksenia [RU/DE]; Beerentalweg 119, 21077 Hamburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002689

(22) Internationales Anmeldedatum:  
14. März 2005 (14.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

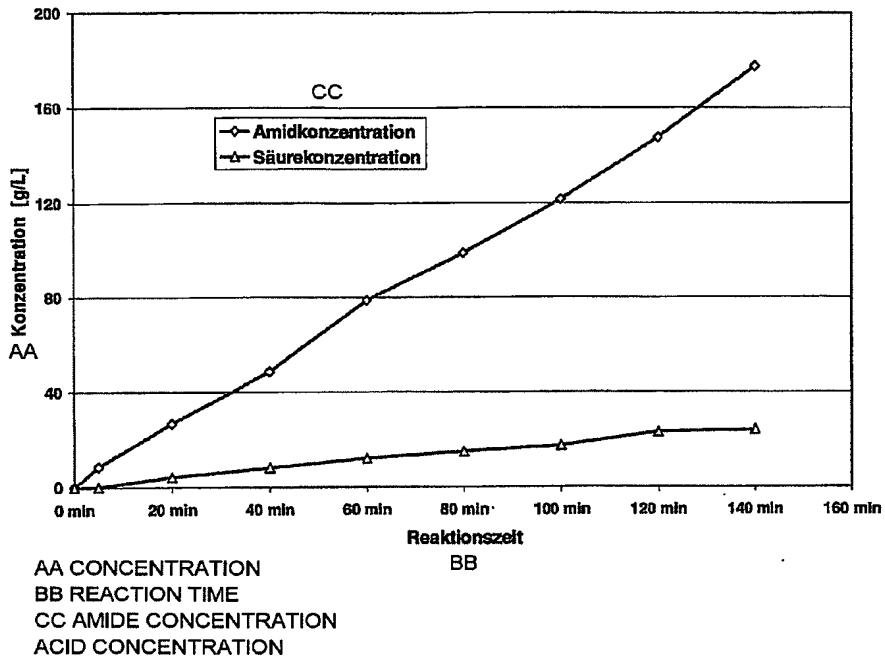
(30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 013 847.8 20. März 2004 (20.03.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DEGUSSA AG [DE/DE]; Bennigsenplatz 1, 40474 Düsseldorf (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CYANIDE TOLERANT NITRILHYDRATASES

(54) Bezeichnung: CYANIDTOLERANTE NITRILHYDRATASEN



(57) Abstract: The invention relates to cyanide tolerant nitrilhydratases produced from *Pseudomonas* genus microorganisms which exhibit a high cyanide tolerance. Said invention also relates to the use of said compounds for producing amides from nitriles in the presence of cyanides, polynucleotide sequences coding for said enzymes and said enzymes.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/090394 A2



(74) **Gemeinsamer Vertreter:** DEGUSSA AG; Intellectual Property Management, PATENTE und MARKEN, Standort Hanau, Postfach 13 45, 63403 Hanau (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

**Veröffentlicht:**

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft cyanidtolerante Nitrilhydratasen aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, die eine erhöhte Cyanidtoleranz aufweisen, ihre Verwendung zur Herstellung von Amiden aus Nitrilen in Gegenwart von Cyaniden und für diese Enzyme kodierende Polynukleotidsequenzen und diese Enzyme.

**Cyanidtolerante Nitrilhydrataser**

Die Erfindung betrifft cyanidtolerante Nitrilhydrataser insbesondere aus *Pseudomonas putida*- oder *Pseudomonas marginalis*- Stämmen, die eine erhöhte Cyanidtoleranz 5 aufweisen, ihre Verwendung zur Herstellung von Amiden aus Nitrilen in Gegenwart von Cyaniden und für dieses Enzym kodierende Polynukleotidsequenzen.

Die Umsetzung von  $\alpha$ -Hydroxynitrilen (Cyanhydrinen) und  $\alpha$ -Aminonitrilen zu den entsprechenden Amiden mittels 10 Nitrilhydrataser eröffnet eine neue Synthesevariante zu  $\alpha$ -Hydroxysäuren und  $\alpha$ -Aminosäuren, da  $\alpha$ -Hydroxy- und  $\alpha$ -Aminoamide auf einfache Weise verseift werden können (Process and catalysts for the production of methionine. Ponceblanc, Herve; Rossi, Jean-Christophe; Laval, Philip; 15 Gros, Georges. (Rhone-Poulenc Animal Nutrition SA, Fr.), (WO 2001060789). Alternativ können  $\alpha$ -Hydroxyamide auch mit Alkali- oder Erdalkalimetallhydroxiden zu den entsprechenden Salzen der Hydroxysäuren umgesetzt werden. Besonders bevorzugt ist hierbei die Umsetzung von 4- 20 Methylthio- $\alpha$ -hydroxybutyramid (MHA-Amid) mit Calciumhydroxid, da Calcium-MHA direkt als alternative Produktform zu Methionin oder MHA als Futtermittelzusatz eingesetzt werden kann.

Allerdings zerfallen  $\alpha$ -Hydroxynitrile und  $\alpha$ -Aminonitrile 25 leicht zu Aldehyden und Blausäure bzw. Aldehyden, Blausäure und Ammoniak. Die entstehende Blausäure ist ein starker Inhibitor für fast alle bekannten Nitrilhydrataser, mit Ausnahme der Nitrilhydratase aus *Rhodococcus equi* XL-1, die bei 20 mM Cyanid den bisher geringsten bekannten 30 Aktivitätsverlust zeigt. (Production of amides from nitriles by *Rhodococcus equi* cells having a cyanide resistant-nitrile hydratase. Nagasawa, Tohru; Matsuyama, Akinobu. (Daicel Chemical Industries, Ltd., Japan), (EP 1 266 962 A).

Die geringe Produktivität von ca. 8 g Amid pro g Biotrockenmasse der Ruhezellen, die lange Reaktionszeit von 43 Stunden und die relativ geringe Produktkonzentration von 75 g/L führen zur Suche nach verbesserten Nitrilhydratases.

- 5 Das Ziel der hier beschriebenen Erfindung ist deshalb einen Biokatalysator zur Verfügung zu stellen, der nicht diesen Einschränkungen unterliegt. Außerdem ist eine noch höhere Toleranz des Biokatalysators gegenüber Cyanid vorteilhaft, da  $\alpha$ -Hydroxynitrile und  $\alpha$ -Aminonitrile zur Gewährleistung einer schnellen und vollständigen Umsetzung des Aldehyds bevorzugt mit einem 1-3 %-igen Überschuss an Blausäure hergestellt werden, der zum Teil im Produkt verbleibt. Somit können während der Biotransformation Cyanidkonzentrationen auftreten, die 20 mM übersteigen.
- 10 15 Nebenprodukte und Reagentien wie als Hilfsbasen eingesetzte Amine dürfen die Nitrilhydratase-Aktivität ebenfalls nicht inhibieren.

- 20 Aufgabe der Erfindung ist es, Nitrilhydratases bereitzustellen, die gegenüber bei der Umsetzung von Nitrilen zu Amiden in der Reaktionslösung vorhandenen Cyanidionen eine erhöhte Stabilität aufweisen.

- 25 Gegenstand der Erfindung sind isolierte Polynukleotide, insbesondere aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudonomas*, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren, die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den in den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 enthaltenden Aminosäuresequenzen, wobei die Polypeptide, enthaltend die Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5 oder 7, 8, 10, zusammen jeweils die Aktivität einer cyanidtoleranten 30 Nitrilhydratase besitzen bzw. diese Nitrilhydratase bilden.

Bevorzugt stammen die Polynukleotide aus *Pseudonomas putida* oder *Pseudonomoas marginalis*.

Gegenstand der Erfindung sind weiter Polynukleotide, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotide, enthaltend die oder bestehend aus den Nukleotidsequenzen aus den SEQ ID NO:1, 4, 6, 9 oder 5 dazu komplementären Nukleotidsequenzen,
  - b) Polynukleotide, enthaltend Nukleotidsequenzen, die den Sequenzen aus a) im Rahmen der Degeneriertheit des genetischen Codes entsprechen,
  - c) Polynukleotide enthaltend Nukleotidsequenzen gemäss 10 a), die funktionsneutrale Sinnmutationen enthalten,
  - d) Polynukleotide, die mit den komplementären Sequenzen aus a) oder c) unter stringenten Bedingungen hybridisieren,
- 15 wobei die Polynukleotide für eine cyanidtolerante Nitrilhydratase kodieren.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso die durch diese Polynukleotide kodierten Polypeptide mit den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5 oder 7, 8, 10 mit der Aktivität von 20 cyanidtoleranten Nitrilhydratasen aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudonomas*, die sowohl in den Mikroorganismen angereichert oder in isolierter Form vorliegen können. SEQ ID NO:2 und 7 kodieren für die alpha-Untereinheiten der Nitrilhydratasen, SEQ ID NO:3 und 8 für die beta- 25 Untereinheiten der Nitrilhydratasen und SEQ ID NO:5 und 10 für Aktivatorproteine deren Co-Expression für die Aktivität der Nitrilhydratasen essentiell ist (Nojiri et al., 1999, *Journal of Biochemistry*, 125:696-704)

Erfindungsgemäß werden bevorzugt Wirtszellen verwendet, die 30 durch die erfundungsgemäßen Polynukleotide transformiert oder transfektiert wurden.

Die Wirtszellen können zu den Eukaryonten oder Prokaryonten zählen, für die ein stabiles Expressionssystem bekannt ist, insbesondere

Als Host-Organismus dienen bevorzugt Mikroorganismen, für  
5 Expressionssysteme gibt, wie z. B. *Pseudomonas*, *Pichia*, verschiedene Hefen, *Saccharomyces*, *Aspergillus* oder der Familie *Streptomyces*, insbesondere *E. coli*. Mikroorganismen der Gattung *Rhodococcus* sind ebenso geeignet.

10 Vektor DNA kann in eukaryonische oder prokaryonische Zellen durch bekannte Transformations- oder Transfektionstechniken eingeführt werden.

„Transformation“, „Transfektion“, „Konjugation“ und „Transduktion“ beziehen sich auf nach dem Stand der 15 Techniken bekannten Maßnahmen, um fremde DNA einzuführen.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank von *Pseudomonas marginalis* 20 oder *Pseudomonas putida*, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenzen der erfindungsgemäßen Polynukleotide aus der SEQ ID No:1, 4 oder 6, 9 oder Fragmente davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

25 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodieren, oder um solche 30 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenzen mit denen der erfindungsgemäßen Gene aufweisen. Sie können ebenso als Sonde auf sogenannte "arrays", "micro arrays"

oder "DNA chips" aufgebracht werden, um die entsprechenden Polynukleotide oder hiervon abgeleitete Sequenzen wie z.B. RNA oder cDNA zu detektieren und zu bestimmen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung 5 enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, 10 enthalten mindestens 25 oder 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge 15 von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf 20 Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen Polynukleotide 25 gemäß SEQ ID NO:1, 4, 6, 9 oder darin enthaltene Fragmente und auch solche ein, die zu wenigstens 90 %, 93 %, 95 %, 97 % oder 99% identisch sind mit den Polynukleotiden gemäß SEQ ID NO:1, 4, 6, 9 oder darin enthaltenen Fragmenten.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, 30 die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen Polypeptide gemäß den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10, und auch solche

ein, die zu wenigstens 90%, und besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit den Polypeptiden gemäß den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10.

- 5 Die aus der gewünschten Genbank erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler  
10 (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich den in aus SEQ ID No. 1, 4, 6, 9 enthaltenen Sequenzen durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der  
15 Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit diesen Sequenzen oder Teilen von davon hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen  
20 Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen  
25 Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 30 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter  
35 Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus

SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, insbesondere von 20, 30 oder 40.

- 5 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.
- 10 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 90%
- 15 identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschrifte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ
- 20 niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriften durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x

SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 90% bis 95% Identität 5 zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

10 Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer 15 Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Im allgemeinen geht man so vor, dass man ein gut exprimierbares Gen in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl, Gene mit schwächerer Expressionsleistung auf einem Vektor mit höherer Kopienzahl und/oder starkem 20 Promotor kloniert. Die Wirtszellen sind mit diesen Vektoren in der Weise transformiert, dass sie im Vergleich zum Startorganismus mindestens jeweils eine zusätzliche Kopie der für die Bildung von Nitrilhydratase kodierenden Nukleotidsequenzen enthalten.

25 Die so hergestellten transformierten oder rekombinanten Mikroorganismen insbesondere der Gattung *Pseudomonas* sind ebenfalls Teil der Erfindung.

Es wurde gefunden, dass die Verstärkung der für die erfindungsgemäße Nitrilhydratase und das Helferprotein P47K 30 kodierenden Gene in Mikroorganismen zu einer erhöhten Produktion der Nitrilhydratase oder auch zu einer erhöhten Aktivität der Nitrilhydratase führen.

- Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise
- 5 die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert, im Vergleich zum nicht rekombinierten Startorganismus.
- 10 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch
- 15 induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.
- 20 Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin
- 25 eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso

- 1) ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Amiden aus Nitrilen, das folgende Schritte aufweist:
- 30
- a) Umsetzung einer (eine) Nitrilgruppe(n) enthaltenden Verbindung mit einem mikrobiellen Enzym, das Nitrilhydratase-Aktivität aufweist und

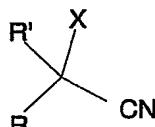
- 5 b) Abtrennung des gebildeten Amids, wobei man  
c) für die Umsetzung des Nitrils zum Amid eine  
erfindungsgemäße Nitrilhydratase einsetzt. Deren  
Restaktivität beträgt nach der Umsetzung von  
Methacrylnitril in Gegenwart von 20 mM (mM =  
mmol/l) Cyanidionen bei 20°C nach 30 min.  
bevorzugt mindestens 90 % der Restaktivität  
dieselben Enzyms, wenn dieses das unter ansonsten  
denselben Bedingungen in Abwesenheit von  
10 Cyanidionen für die Umsetzung eingesetzt wurde.

15 2) ein Verfahren gemäß 1), dadurch gekennzeichnet, dass  
die Restaktivität nach der Umsetzung in Gegenwart von  
50 mM Cyanidionen mindestens 60 % beträgt,  
3) ein Verfahren gemäß 1) oder 2), dadurch  
gekennzeichnet, dass man das Enzym produzierende und  
enthaltende Mikroorganismen oder deren Lysat einsetzt.

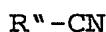
20 4) ein Verfahren gemäß 3), dadurch gekennzeichnet, dass  
man ruhende Zelle des Mikroorganismus einsetzt,  
5) ein Verfahren gemäß 1) oder 2), dadurch  
gekennzeichnet, dass man das gereinigte Enzym  
einsetzt,  
6) ein Verfahren gemäß 1) bis 5), dadurch gekennzeichnet,  
dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung  
Pseudomonas stammt, insbesondere Pseudomonas putida  
25 oder Pseudomonas marginalis,  
7) ein Verfahren gemäß 6, dadurch gekennzeichnet, dass  
das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung Pseudomonas  
stammt, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 und  
DSM 16276, und die Aminosäuresequenzen mit den  
30 Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 aufweisen,

- 8) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 7), dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen der allgemeinen Formeln

5



(I)



(II)

in der bedeuten:

- X: OH, H, Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen, NH<sub>2</sub>  
 10 R: H, gesättigter Alkylrest mit 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder unverzweigt, gegebenenfalls NH<sub>2</sub>-substituiert  
 ungesättigte Alkylreste mit einer Doppelbindung und 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder  
 15 unverzweigt, Cycloalkylgruppen mit 3 bis 6 C-Atomen,  
 mit Alkylthiogruppen substituierte  
 Alkylenreste, wobei Alkyl hier einem C<sub>1</sub> bis C<sub>3</sub>-Rest  
 20 und Alkylen einem zweiwertigen C<sub>3</sub> bis C<sub>8</sub>-Rest entspricht,  
 R': H, wenn R kein H bedeutet, Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen,  
 25 R'': ein- oder zweikerniger ungesättigter Ring, mit 6 bis 12 C-Atomen, gegebenenfalls substituiert mit einer oder zwei Alkylgruppen (C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>), Cl, Br, F substituiert,  
 einwertiger Alkylnitrilrest mit 1 bis 6 C-Atomen zu den entsprechenden Amiden umsetzt,  
 30 9) ein Verfahren gemäß 8), dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) in

Gegenwart von Blausäure oder einem Salz der Blausäure umsetzt,

- 10) ein Verfahren gemäß 9), dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in Gegenwart von 0,1 mol% Cyanid bis 5 3 mol% Cyanid bezogen auf das eingesetzte Nitril durchführt, bevorzugt > 2 bis 3 mol%. Dies entspricht bei 1 mol Endkonzentration bei 3 mol% 30 mMol Cyanid,
- 10 11) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 10), dadurch gekennzeichnet; dass man als Nitril Methioninnitril einsetzt,
- 12) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 10), dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-Hydroxy-4-methylthiobutyronitril einsetzt.

15 Bevorzugt setzt man ein Reaktionsgemisch ein, wie man es erhält, wenn man Blausäure, 3-Methylthiopropionaldehyd in Gegenwart einer Hilfsbase wie z.B. Triethylamin nach dem Stand der Technik umsetzt.

20 Es kann vorteilhaft ohne Aufreinigung eingesetzt werden.

Dies weist auf die zusätzliche Stabilität der erfundungsgemäßen Enzyme gegenüber Aldehyden und Aminen hin.

- 25 13) Ein Verfahren, bei dem man als Vorstufe für Methacrylamid 2-Hydroxy-2-methylpropionitril, einsetzt.
- 14) Die Erfundung ist ebenso ausgerichtet auf isolierte und gereinigte Mikroorganismen der Gattung Pseudomonas, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 30 (MA32, Pseudomonas marginalis) und DSM 16276 (MA113, Pseudomonas putida), und

- 15) Cyanidtolerante Nitrilhydrataser, isoliert aus den Stämmen der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere aus den unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276 hinterlegten Stämmen von *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas marginalis*.

5 Die Hinterlegung erfolgte am 09.03.2004 bei der DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig, nach dem Budapester Vertrag.

- 10 Diese Stämme sind besonders geeignet, die erfindungsgemäßen Enzyme zu produzieren.

„Isolierte und gereinigte Mikroorganismen“ betrifft Mikroorganismen, die in einer höheren Konzentration als natürlich zu finden vorliegen.

- 15 Gegenstand der Erfindung ist ebenso ein Verfahren zur Herstellung der oben beschriebenen cyanidtoleranten Nitrilhydratase, bei dem man

- 20 a) einen diese Nitrilhydratase produzierenden Mikroorganismus, insbesondere der Gattung *Pseudomonas marginalis* oder *Pseudomonas putida*, unter Bedingungen fermentiert, bei denen sich das Enzym in dem Mikroorganismus bildet, und
- b) frühestens nach dem Durchlaufen der logarithmischen Wachstumsphase die Zellen erntet.

Anschließend setzt man

- 25 a) entweder den das Enzym enthaltenden Mikroorganismus als in Form von ruhenden Zellen, gegebenenfalls nach der Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran oder
- b) das Lysat der Zellen oder
- c) das aus den Zellen des Mikroorganismus mit bekannten Maßnahmen isolierte Enzym

30

zur erfindungsgemäßen Umwandlung von Nitrilen in Amide ein.

Bei der Nitrilhydratase kann es sich sowohl um ein mit nicht rekombinanten Mikroorganismen erzeugtes als auch um ein rekombinant erzeugtes Enzym handeln.

- 5 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide, wobei man einen dieser Polypeptide produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der zugehörigen Polynukleotide induziert und
- 10 10 die Enzyme gegebenenfalls aus der Kultur isoliert.

Es handelt sich im allgemeinen um ein Verfahren, bei dem man

- a) 15 Mikroorganismen insbesondere der Gattungen *Pseudomonas marginalis* oder *Pseudomonas putida* fermentiert, in denen man isolierte Polynukleotide aus Mikroorganismus der Familie *Pseudomonas*, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren, die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den Sequenzen in den SEQ ID NO:2, 3 und 5 oder 7, 8 und 10 enthaltenden
- 20 20 Aminosäuresequenzen, wobei die Polypeptide jeweils gemeinsam die Aktivität einer cyanidtoleranten Nitrilhydratase besitzen, verstärkt, insbesondere rekombinant überexprimiert,
- b) 25 aus diesen Mikroorganismen das Enzym mit Nitrilhydrataseaktivität gegebenenfalls isoliert oder eine dieses Enzym enthaltende Proteinfraction herstellt, und
- c) 30 die Mikroorganismus gemäss a) oder das Enzym gemäss oder die dieses enthaltende Fraktion b) in ein Medium überführt, das ein Nitrilgruppen-haltige Verbindung der allgemeinen Formeln (I) und (II) enthält.

Das zur Fermentation verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for

- 5 General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B.

- 10 Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 15 Als Stickstoffquelle können vorteilhaft organische Nitrile oder Säureamide wie Acetonitril, Acetamid, Methacrylnitrile, Methacrylamid, Isobutyronitril, Isobutyramid oder Harnstoff auch in Kombination mit anderen Stickstoffhaltigen Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, 20 Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung 25 verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten

- 30 wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen

Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

- 5 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder
- 10 Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 10°C bis 40°C und vorzugsweise bei 10°C bis 30°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sie die logarithmische Wachstumsphase durchschritten hat. Dieses
- 15 Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 70 Stunden erreicht. Im Anschluss daran werden die Zellen bevorzugt geerntet, gewaschen und in einem Puffer als Suspension bei einem pH-Wert von 6-9, insbesondere von 6,8 bis 7,9 aufgenommen. Die Zellkonzentration beläuft sich auf
- 20 1-25%, insbesondere 1,5 bis 15% (Feuchtgewicht/v). Die Permeabilität kann mit physikalischen oder chemischen Methoden so, z. B. mit Toluol wie bei Wilms et al., J. Biotechnol., Vol. 86 (2001), 19-30 beschrieben, erhöht werden, dass das umzuandelnde Nitril die Zellwand
- 25 durchdringen und das Amid austreten kann.

Folgende Nitrile werden bevorzugt umgesetzt:

gesättigte Mononitrile:

Acetonitril, Propionitril, Butyronitril, Isobutyronitril, Valeronitril, Isovaleronitril, Capronitril

- 30 gesättigte Dinitrile:

Malonitril, Succinonitril, Glutaronitril, Adiponitril

aromatische unsubstituierte und substituierte Mono- und Dinitrile:

Benzonitril, 2,6-Difluorbenzonitril, Phthalonitril,  
Isophthalonitril, Terephthalonitril,

$\alpha$ -Aminonitrile:

- 5  $\alpha$ -Aminopropionitril,  $\alpha$ -Aminomethylthiobutyronitril,  $\alpha$ -Aminobutyronitril, Aminoacetonitril, alle von natürlichen Aminosäuren abgeleitete Nitrile,  $\alpha$ -Amino-3,3-dimethylpropionitril  $\alpha$ -Amino-2,3-dimethylpropionitril

Nitrile mit Carboxyl-Gruppen:

Cyanessigsäure

10  $\beta$ -Aminonitrile:

Amino-3-propionitril

ungesättigte Nitrile:

Acrylnitril, Methacrylonitril, Allylcyanid, Crotononitril

$\alpha$ -Hydroxynitrile:

- 15  $\alpha$ -Hydroxy-n-propionitril,  $\alpha$ -Hydroxy-n-butyronitril,  $\alpha$ -Hydroxy-isobutyronitril,  $\alpha$ -Hydroxy-n-hexanonitril,  $\alpha$ -Hydroxy-n-heptanonitril,  $\alpha$ -hydroxy-n-octanonitril,  $\alpha$ , $\gamma$ -Dihydroxy- $\beta$ , $\beta$ -dimethylbutyronitril, Acroleincyanohydrin, Methacrylaldehyd cyanohydrin, 3-Chlorolactonitril, 4-Methylthio- $\alpha$ -hydroxybutyronitril und  $\alpha$ -Hydroxy-phenylpropionitril.

Die Konzentration der umzusetzenden Nitrile in der Reaktionslösung ist nicht auf bestimmte Bereiche begrenzt.

- 25 Um eine Inhibierung der Enzymaktivität durch das Substrat zu vermeiden, hält man die Konzentration des Nitrils im allgemeinen auf 0,02 bis 10 w/w%, insbesondere 0,1 bis 2 w/w%, bezogen auf die Menge des Biokatalysators als getrocknete Zellmasse. Das Substrat kann zu Beginn der Umsetzung insgesamt oder im Verlauf der Umsetzung 30 kontinuierlich oder diskontinuierlich zugesetzt werden.

Die Bestimmung des Trockengewichts erfolgt mit dem Moisture Analyser MA 45 (Sartorius).

Wenn die Löslichkeit der Nitrilverbindung in dem wässrigen Reaktionssystem zu gering ist, kann ein Lösungsvermittler 5 zugesetzt werden.

Die Reaktion kann aber alternativ auch in einem Zweiphasensystem Wasser/organische Lösungsmittel durchgeführt werden.

Bei der Verwendung von Zellen des Mikroorganismus als 10 enzymatisch aktivem Material, ist die Menge der eingesetzten Zellen im Verhältnis zur Substratmenge bevorzugt 0,02 bis 10 w/w% als getrocknete Zellmasse.

Es ist auch möglich, das isolierte Enzym nach allgemein 15 bekannten Techniken zu immobilisieren und in dieser Form dann einzusetzen.

Die Reaktion wird im allgemeinen bei Temperaturen von -5°C bis 50°C, insbesondere 0°C bis 30°C, und einer Zeitdauer von 0,1 bis 100 Stunden durchgeführt.

Der einzuhaltende pH-Wert des Reaktionsgemisches ist so 20 lange nicht auf bestimmte Werte begrenzt, wie die enzymatische Aktivität nicht beeinträchtigt wird. Nach der Umsetzung kann das gebildete Amid aus der Reaktionslösung wie bekannt abgetrennt und gereinigt werden.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren, bei 25 dem man das Amid bzw. die das Amid enthaltende Lösung zum Beispiel von den Zellen der Biomasse abtrennt und das Amid entweder zu der entsprechenden Säure verseift oder unter Zusatz von Alkali- oder Erdalkalimetallyhydroxiden zu den entsprechenden Salzen der Säuren umsetzt. Bevorzugt wird 30 MHA-Amid mit Calciumhydroxid verseift und das entsprechende Calciumsalz isoliert.

## Beispiele

## Beispiel 1

## Anzuchtbedingungen

Die Vorkulturen wurden innerhalb von 24 h unter Schütteln  
 5 bei 30°C in einem Volumen von 5 ml in Glasröhrchen  
 angezogen. Mit 1 ml der Vorkultur wurden 100 ml der  
 Hautkultur angeimpft und 42 h bei 25°C in einem  
 Erlenmeyerkolben mit einem Gesamtvolumen von 1000 ml  
 geschüttelt.

Medium für die Vorkultur (pH 7,0)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Na-citrat	0,5 g
Glycerin	2 g
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,004 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Acetamid	2 g
Spurensalzlösung	0,1 ml
Demineralisiertes Wasser	Ad. 1000 ml

10

Medium für die Hauptkultur (pH 7,0)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Natriumcitrat	0,5 g
Glycerin	2 g
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,004 g

MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Acetamid	10 g
Spurensalzlösung	0,1 ml
Demineralisiertes Wasser	Ad. 1000 ml

Spurensalzlösung	
EDTA, Na <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	158 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	4,7 mg
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	70 mg
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	18 mg
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	16 mg
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	4,7 mg
CoSO <sub>4</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	5,2 mg
Demineralisiertes Wasser	Ad. 1000 ml

### Beispiel 2

#### Isolierung und Identifizierung der Mikroorganismen

- 5 Die beiden Stämme MA32 und MA113 wurden durch Bestimmung der Nitrilhydratase-Aktivität der Ruhezellen in Gegenwart von 2 mM Kaliumcyanid selektiert.

#### Eigenschaften von MA32:

Zellform	Stäbchen
Breite	0,6 - 0,8 µm
Länge	1,5 - 3,0 µm

	Beweglichkeit	+
	Geißeln	polar > 1
5	Gram-Reaktion	-
	Lyse durch 3% KOH	+
	Aminopeptidase (Cerny)	+
	Oxidase	+
	Katalase	+
10	Wachstum bei 41°C	-
	Substratverwertung	
	Adipat	-
15	Citrat	+
	Malat	+
	Phenylacetat	-
	D-Glucose	+
	Maltose	-
20	Mannitol	+
	Arabinose	+
	Mannose	+
	Trehalose	+
	Sorbitol	+
25	Erythrol	+
	Citraconat	+
	Inositol	+
	ADH	+
30	Urease	-
	Hydrolyse von Gelatine	+
	Hydrolyse von Esculin	+
35	Levan aus Saccharose	+
	Denitrification	+
	Lecithinase	+
40	Fluoreszens	+
	Pyocyanin	-
45	Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch für die Gruppe I der Pseudomonaden	

Die Analyse eines 484 bp langen Abschnitts der 16S rRNA ergab eine 100%-ige Übereinstimmung mit der Sequenz von *Pseudomonas marginalis*

Unter Berücksichtigung aller Daten konnte MA32 als *Pseudomonas marginalis* identifiziert werden.

5 Eigenschaften von MA113:

	Zellform	Stäbchen
	Breite	0,6 - 0,8 µm
	Länge	1,5 - 3,0 µm
10	Beweglichkeit	+
	Geißeln	polar > 1
	Gram-Reaktion	-
	Lyse durch 3% KOH	+
15	Aminopeptidase (Cerny)	+
	Oxidase	+
	Katalase	+
	Wachstum bei 41°C	-
20	Substratverwertung	
	Adipat	-
	Citrat	+
	Malat	+
25	Phenylacetat	+
	D-Glucose	+
	Maltose	-
	Mannitol	-
	Arabinose	-
30	Mannose	-
	Trehalose	-
	Inositol	-
	β-Alanin	+
	α-Ketoglutarat	+
35	Benzylamin	+
	Hippurat	+
	Azelat	+
	D-Mandelat	+
40	ADH	+
	Urease	-
	Hydrolyse von Gelatine	-
	Hydrolyse von Esculin	-
45	Levan aus Saccharose	-

- |    |   |   |
|----|---|---|
|    | Denitrification   | - |
|    | Lecithinase   | - |
| 5  | Fluoreszens   | + |
|    | Pyocyanin   | - |
| 10 | Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch für die Gruppe I der Pseudomonaden   |   |
|    | Die Analyse eines 476 bp langen Abschnitts der 16S rRNA ergab eine 100%-ige Übereinstimmung mit der Sequenz von <i>Pseudomonas putida</i> |   |
| 15 | Unter Berücksichtigung aller Daten konnte MA113 als <i>Pseudomonas putida</i> identifiziert werden.                                       |   |

### Beispiel 3

#### 20 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Die Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen, durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt und im Standardpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5) resuspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension wurden zu 700 µl des Standardpuffers gegeben und zum Starten der Reaktion mit 250 µl einer 200 mM Lösung des Nitrils in Standardpuffer versetzt. Die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension war hierbei so bemessen, daß das Nitril nach 10 min bei 20°C zu 5-30 % umgesetzt war. Nach 10 min bei 20°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl halbkonzentrierter Phosphorsäure abgestoppt und die Zellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt.

HPLC-Analytik	
Säule	<b>Intersil ODS-3V (GL Sciences Inc.)</b>
Mobile Phase	Gemisch aus 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,3 und Acetonitril im Verhältnis 85:15 für Methioninnitril, MHA-Nitil und Acetoncyanhydrin bzw. 99:1 für alle anderen Substrate
Flußrate	1 ml/min
Detektion	UV bei 200 nm

Die Aktivität von einem U ist definiert als die Menge an Enzym, die 1  $\mu$ mol Methacrylnitril in einer Minute zum Amid umsetzt. Entstand neben dem Amid auch die Säure, wurde ein

5 U definiert als die Menge an Enzym, die 1  $\mu$ mol Methacrylnitril in einer Minute zu Amid und Säure umsetzt.

In Abbildung 1 und in Abbildung 2 werden die relative Aktivitäten der Stämme MA32 und MA113 dargestellt.

#### Beispiel 4

10 Einfluß von Cyanid auf die Aktivität der Nitrilhydratase

50  $\mu$ l einer analog zu Beispiel 3 hergestellten Zellsuspension wurden zu 700  $\mu$ l des Standardpuffers gegeben, der 0; 21,4; 53,6 und 107,1 mM Kaliumcyanid enthielt (Endkonzentration 0, 20, 50, 100 mM Cyanid. Zum

15 starten der Reaktion wurden 200  $\mu$ l einer 200 mM Lösung des Nitrils im Standardpuffer zugesetzt, der jeweils die selbe Cyanidkonzentration aufwies wie die übrige Reaktionslösung. Die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension war

hierbei so bemessen, daß das Nitril im Ansatz ohne Cyanid

20 nach 10 min bei 20°C zu 16 % umgesetzt war. Nach 10 min bei 20°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20  $\mu$ l halbkonzentrierter Phosphorsäure abgestoppt und der Umsatz wurde analog zu Beispiel 2 bestimmt.

In Abbildung 3 und in Abbildung 4 werden die relativen Aktivitäten für die Umsetzung von Methacrylnitril in Abhängigkeit von der Cyanidkonzentration wiedergegeben.

Beispiel 5

- 5 Umsetzung von Acetoncyanhydrin mit *Pseudomonas marginalis* MA32 Ruhezellen

*Pseudomonas marginalis* MA32 Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen und abzentrifugiert. Eine solche Menge der Zellen, die 1,16 g Biotrockenmasse enthielt, 10 wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 auf ein Endvolumen von 50 ml verdünnt. Zusätzlich wurden dem Reaktionsgemisch 0,02 mM 2-Methyl-1-propanboronsäure zugesetzt. Frisch destilliertes Acetoncyanhydrin wurde bei 4°C unter heftigem Rühren kontinuierlich mit einer solchen 15 Rate zugegeben, daß die Konzentration während der Reaktion 5 g/L zu keinem Zeitpunkt überschritt. Der pH wurde konstant bei 7,5 gehalten. Die Reaktionsverfolgung wurde mittels HPLC wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Nach 140 min waren 10,0 g des Nitrils vollständig zu 10,7 g 20 Amid und 1,4 g Säure umgesetzt worden.

In Abbildung 5 wird der mit dem Stamm MA113 erzielte zeitliche Reaktionsablauf dargestellt.

Beispiel 6

- Umsetzung von rohem MHA-Nitril mit *Pseudomonas marginalis* 25 MA32 Ruhezellen

*Pseudomonas marginalis* MA32 Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen und abzentrifugiert. Eine solche Menge der Zellen, die 0,34 g Biotrockenmasse enthielt, wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 auf ein 30 Endvolumen von 70 ml verdünnt. Zusätzlich wurden dem Reaktionsgemisch 0,02 mM 2-Methyl-1-propanboronsäure zugesetzt. Das rohe MHA-Nitril wurde bei 4°C unter heftigem

Röhren kontinuierlich mit einer solchen Rate zugegeben, daß die Konzentration während der Reaktion 10 g/L zu keinem Zeitpunkt überschritt. Der pH wurde konstant bei 8,0 gehalten. Die Reaktionsverfolgung wurde mittels HPLC wie in 5 Beispiel 2 beschrieben durchgeführt. Nach 510 min waren 10,05 g des Nitrils vollständig zu 11,13 g Amid und 0,31 g Säure umgesetzt worden. Das entspricht einer Endkonzentration von 139 g Amid pro Liter.

Das MHA-Nitril war direkt aus 3-Methylthiopropionaldehyd 10 und einem leichten Überschuss an Blausäure hergestellt worden. Eine 50 mM Lösung dieses MHA-Nitrils in Wasser enthielt 0,5 mM Cyanid (Spektroquant®, Merck).

In Abbildung 6 wird der mit dem Stamm MA32 erzielte zeitliche Reaktionsablauf dargestellt.

15 Beispiel 7

Klonierung des Nitrilhydratase-Gen-clusters aus *Pseudomonas marginalis* MA 32 und Konstruktion eines Expressionsvektors

Der Gen-Cluster der Nitrilhydratase enthaltend eine  $\alpha$ -Untereinheit,  $\beta$ -Untereinheit und einem Nitrilhydratase- 20 Aktivatorprotein, dessen Co-Expression für die Aktivität der Nitrilhydratase essentiell ist (Nojiri et al., 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704), wurde mit den Primern 1F und 1R per PCR amplifiziert, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NdeI und HindIII einfügten. Das 25 so erhaltene PCR-Produkt wurde in einen mit NdeI und HindIII geschnittene Vektor ligiert, bei dem die eingefügten Gene unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors stehen. Der so entstandene Expressionsvektor heißt pKE31.

Die Restriktionskarte findet sich in Abbildung 7, die 30 Sequenz unter SEQ ID NO:1.

Das Expressionsplasmid wurde in den Stamm *E. coli* DSM 14459 transformiert, der bei der Deutschen Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) am 22.08.2001 hinterlegt worden ist.

Primer:

1F	5'-CTC CAC CAT ATG AGT ACA GCT ACT TCA ACG -3'
1R	5'-CTT CAT AAG CTT CTA TCT CGG ATC AAA TGG-3'

- 5 1F: SEQ ID NO:11  
 1R: SEQ ID NO:12

Die Gene befinden sich auf den Abschnitten von SEQ ID NO:1:

- Gen der  $\alpha$ -Untereinheit: nt 25-609  
 Gen der  $\beta$ -Untereinheit: nt 650-1312  
 10 Gen des Aktivatorproteins: nt 1309-2577

Beispiel 8

Klonierung des Nitrilhydratase-Gen-clusters aus *Pseudomonas putida* MA113

- Der Gen-Cluster der Nitrilhydratase bestehend aus  $\alpha$ -Untereinheit,  $\beta$ -Untereinheit und einem Nitrilhydratase-Aktivatorprotein, dessen Co-Expression für die Aktivität der Nitrilhydratase essentiell ist (Nojiri et al., 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704), wurde mit den Primern 1F und 1R per PCR amplifiziert.

- 20 Die Sequenz findet sich unter SEQ ID NO:6.

Primer:

2F	5'-ATG ACG GCA ACT TCA ACC CCT GGT G-3'
2R	5'-TCA GCT CCT GTC GGC AGT CG-3'

2F:SEQ ID NO:13

2R:SEQ ID NO:14

Die Gene befinden sich auf den Abschnitten von SEQ ID NO:5:

	Gen der $\alpha$ -Untereinheit:	nt	1-582
5	Gen der $\beta$ -Untereinheit:	nt	624-1286
	Gen des Aktivatorproteins:	nt	1283-2360

### Beispiel 9

# Heterologe Expression der Nitrilhydratasen aus *Pseudomonas marginalis* MA 32 in *E. coli* DSM 14459

10 *E. coli* DSM 14459 wurde im Zusammenhang mit der DE 101 55  
928 hinterlegt.

Die mit pKE31 transformierten Zellen wurden in LB-Medium (LB Bouillon nach Miller, VWR), das 2 mM Eisen(III)-Citrat und 100 µg/ml Ampicillin enthielt, unter Schütteln bei 37°C 15 angezogen. Nach 12 - 16 Stunden wurde eine solche Menge der Vorkultur in eine Hauptkultur überimpft, dass diese eine OD600 von 0,1 aufwies. Das Kulturmedium der Hauptkultur entsprach dem der Vorkultur, enthielt aber zusätzlich 2 g/L L-Rhamnose. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 22 stündiger 20 Kultivierung bei 30°C.

### Beispiel 10

## Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten

Die Anzucht der Zellen und die Bestimmung der Aktivität wurden wie in Beispiel 9 und Beispiel 3 beschrieben durchgeführt.

Die mit dem Plasmid pKE31 transformierten Zellen des Stamms *E. coli* DSM 14459 wiesen eine spezifische Aktivität von 17 U/mg BTM auf.

**Beispiel 11**

Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten in Gegenwart von 100 mM Kaliumcyanid

Die Anzucht der Zellen und die Bestimmung der Aktivitäten 5 in Gegenwart von 100 mM Kaliumcyanid wurden wie in Beispiel 9 und Beispiel 4 beschrieben durchgeführt.

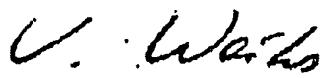
Die mit dem Plasmid pKE31 transformierten Zellen des Stamms *E. coli* DSM 14459 wiesen eine spezifische Aktivität von 11 U/mg BTM auf.

**BUDAPESTER VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN**

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG  
Projekthaus Biotechnologie  
Rodenbacher Chaussee  
63457 Hanau

**EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG:**  
ausgefüllt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
**INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE**

<b>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b>	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugssymbol: <b>JM109 (deltarhab)</b>	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: <b>DSM 14459</b>
<b>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAKONOMISCHE BEZEICHNUNG</b>	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung  <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung     </p> <p style="text-align: center;">eingereicht (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
<b>III. EINGANG UND ANNAHME</b>	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I. bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am <b>2001-08-22</b> (Datum der Ersthinterlegung)<sup>1</sup> eingegangen ist.</p>	
<b>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</b>	
<p>Der unter I. bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapestter Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
<b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>	
<p>Name: <b>DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</b></p> <p>Anschrift: <b>Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</b></p>	<p>Unterschrift(en) der zur Verwaltung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">Datum: <b>2001-08-24</b></p>

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG  
Projekthaus Biotechnologie  
Rodenhäuser Chaussee  
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHREINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
<p>Name: Degussa AG Projekthaus Biotechnologie Anschrift: Rodenhäuser Chaussee 63457 Hanau</p>	<p>Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: <b>DSM 14459</b></p> <p>Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: <b>2001-08-22</b></p>
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHREINIGUNG	
<p>Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am <b>2001-08-22</b> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig</p>	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DIENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST <sup>1</sup>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Verwaltung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  <i>V. Watz</i></p> <p>Datum: <b>2001-08-24</b></p>

- Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
- In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
- Zutreffender ankreuzen.
- Ausfüllen, wenn die Angaben bekräftigt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG  
Service Center Biokatalyse  
Rodenbacher Chaussee 4  
63457 Hanau

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

<b>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b>	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:  MA32	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER:  DSM 16275
<b>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG</b>	
<p>Mit dem unter I bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung  <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
<b>III. EINGANG UND ANNAHME</b>	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an; der bei ihr am 2004-03-04 (Datum der Erst-hinterlegung)<sup>1</sup> eingegangen ist.</p>	
<b>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</b>	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst-hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
<b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Webs</i></p> <p>Datum: 2004-03-09</p>

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Antrag einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG  
Service Center Biokatalyse  
Rodenbacher Chaussee 4  
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
<p>Name: Degussa AG Service Center Biokatalyse Rodenbacher Chaussee 4 63457 Hanau</p>	<p>Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: <b>DSM 16275</b></p> <p>Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung<sup>1</sup>: <b>2004-03-04</b></p>
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	<p>Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am <b>2004-03-08</b> <sup>2</sup> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> lebensfähig <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> nicht mehr lebensfähig</p>
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST <sup>4</sup>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p> <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Wehle</i></p> <p>Datum: <b>2004-03-09</b></p>

<sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.

<sup>4</sup> Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

## INTERNATIONÄLES FORMBLATT

Degussa AG  
Service Center Biokatalyse  
Rodenbacher Chaussee 4  
63457 Hanau

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

## I. KENNzeichnung des Mikroorganismus

Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugssymbol:  
MA113

Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE  
zugewiesene EINGANGSNUMMER:  
DSM 16276

## II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG

Mit dem unter I bezeichneten Mikroorganismus wurde

- eine wissenschaftliche Beschreibung  
 eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung

eingereicht.  
(Zutreffendes ankreuzen).

## III. EINGANG UND ANNAHME

Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2004-03-04 (Datum der Erst-hinterlegung) eingegangen ist.

## IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG

Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst-hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).

## V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE

Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON  
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  
Anschrift: Mascheroder Weg 1b  
D-38124 Braunschweig

Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle  
befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:

Datum: 2004-03-09

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG  
Service Center Biokatalyse  
Rodenbacher Chaussee 4  
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
<p>Name: Degussa AG Service Center Biokatalyse Rodenbacher Chaussee 4 Anschrift: 63457 Hanau</p>	<p>Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: <b>DSM 16276</b> Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung<sup>1</sup>: <b>2004-03-04</b></p>
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
<p>Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am <b>2004-03-08</b> <sup>2</sup> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus</p>	
<p><input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> lebensfähig <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> nicht mehr lebensfähig</p>	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST <sup>4</sup>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: <b>2004-03-09</b></p>

<sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

<sup>3</sup> Treffendes ankreuzen.

<sup>4</sup> Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

0-1	Formular PCT/RO/134 (SAFE) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material erstellt mit	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.169)
0-2	Internationales Aktenzeichen	
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	040061 BT
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	30-31
1-2	Zeile	-
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	22. August 2001 (22.08.2001)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 14459
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
2	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
2-1	Seite	32-33
2-2	Zeile	-
2-3	Angaben betr. Hinterlegung	
2-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
2-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
2-3-3	Datum der Hinterlegung	04. März 2004 (04.03.2004)
2-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 16275
2-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten

3	<b>Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist</b>	
3-1	Seite	34-35
3-2	Zeile	-
3-3	Angaben betr. Hinterlegung	
3-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
3-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
3-3-3	Datum der Hinterlegung	04. März 2004 (04.03.2004)
3-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 16276
3-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten

**VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN**

0-4	Dieses Formular ist mit der Internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	<i>ja</i>
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	<i>Y. Marius-v.d. Neuwieden</i>

**VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN**

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim Internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

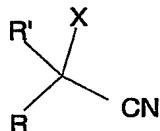
## Patentansprüche

1. Isolierte Polynukleotide, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren, die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den in den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3 und 5 oder 7, 8 und 10 enthaltenden Aminosäuresequenzen.  
5
2. Polynukleotide gemäss Anspruch 1, ausgewählt aus der Gruppe:
  - 10 a) Polynukleotide, enthaltend die Nukleotidsequenzen SEQ ID NO:1, 4, 6, 9 oder dazu komplementäre Nukleotidsequenzen,
  - b) Polynukleotide enthaltend Nukleotidsequenzen, die den Sequenzen aus a) im Rahmen der Degeneriertheit des genetischen Codes entsprechen,  
15
  - c) Polynukleotide enthaltend Nukleotidsequenzen gemäss a), die funktionsneutrale Sinnmutationen enthalten,
  - d) Polynukleotide, die mit den komplementären Sequenzen aus a) unter stringenten Bedingungen hybridisieren, wobei unter stringenten Bedingungen das Waschen in 5XSSC bei einer Temperatur von 50 bis 65°C verstanden wird,  
20 wobei die Polynukleotide für eine cyanidtolerante Nitrilhydratase kodieren.
  - 25 3. Polypeptide, enthaltend Aminosäuresequenzen, die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den Sequenzen mit den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3 und 5 oder 7, 8 und 10.
  4. Polypeptide mit der Aktivität von cyanidtoleranten Nitrilhydratasen gemäß Anspruch 3, deren Restaktivität  
30

nach der Umsetzung von Methacrylnitril in Gegenwart von 20 mM (mM=mmol/l) Cyanidionen bei 20°C nach 30 min. mindestens 90 % der Restaktivität desselben Enzyms beträgt, wenn diese unter ansonsten denselben Bedingungen in Abwesenheit von Cyanidionen für die Umsetzung eingestuft wurde.

5. Sonde oder Primer, enthaltend mindestens 20 aufeinanderfolgende Nukleotide aus den Sequenzen SEQ ID NO:1, 4, 6, 9.
- 10 6. Vektoren, enthaltend ein Polynukleotid, ausgewählt aus den gemäss den Ansprüchen 1 oder 2.
7. Wirtszelle, transformiert oder transfektiert durch die Einführung eines Polynukleotids gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 1 oder 2.
- 15 8. Wirtszelle, transformiert durch die Einführung eines Vektors gemäss Anspruch 6.
9. Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Amiden aus Nitrilen, das folgende Schritte aufweist:
  - 20 a) Umsetzung einer Nitrilgruppen enthaltenden Verbindung mit einem mikrobiellen Enzym (Polypeptid), das Nitrilhydratase-Aktivität aufweist und
  - b) Abtrennung des gebildeten Amidswobei man für die Umsetzung des Nitrils zum Amid eine cyanidtolerante Nitrilhydratase gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 einsetzt.
- 25 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man das genannte Enzym produzierende und enthaltende Mikroorganismen gemäss den Ansprüchen 7 oder 8 oder deren Lysat einsetzt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man ruhende Zelle des Mikroorganismus einsetzt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man eine gereinigte Nitrilhydratase einsetzt.
- 5 13. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* stammt.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus eingesetzten Mikroorganismen der Species *Pseudomonas putida* oder *Pseudomonas marginalis* stammt.
- 10 15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die eingesetzten Mikroorganismen unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276 hinterlegt sind.
- 15 16. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen der allgemeinen Formel



20

(I)

R"-CN

(II)

in der bedeuten:

- X: OH, H, Alkyl, NH<sub>2</sub>;
- 25 R: H, gesättigter Alkylrest mit 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder unverzweigt, gegebenenfalls NH<sub>2</sub>-substituiert, ungesättigte Alkylreste mit einer Doppelbindung und 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder

- unverzweigt, Cycloalkylgruppen mit 3 bis 6 C-Atomen,  
mit Alkylthiogruppen substituierte  
Alkylenreste, wobei Alkyl hier einem C<sub>1</sub> bis C<sub>3</sub>-  
5 Rest  
und Alkylen einem zweiwertigen C<sub>3</sub> bis C<sub>8</sub>-Rest  
entspricht,  
R': H, Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen,  
R": ein- oder zweikerniger ungesättigter Ring, mit 6  
10 bis 12 C-Atomen, gegebenenfalls mit einer oder  
zwei Alkylgruppen (C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>), Cl, Br, F.  
Alkylnitrilrest mit 1 bis 6 C-Atomen  
zu den entsprechenden Amiden umsetzt.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet,  
15 dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) in  
Gegenwart von Blausäure oder einem Salz der Blausäure  
umsetzt.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet,  
20 dass man die Umsetzung in Gegenwart einer  
Anfangskonzentration von mehr als 0,5 mol% Cyanid bis  
3 mol% Cyanid, bezogen auf das eingesetzte Nitril,  
durchführt.
19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9  
bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-  
25 Amino-4-methylthiobutyronitril einsetzt.
20. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9  
bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-  
Hydroxy-4-methylthiobutyronitril einsetzt,  
gegebenenfalls enthalten in der Reaktionsmischung aus  
30 der Herstellung dieses Nitrils.
21. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9  
bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-  
Hydroxy-2-methylpropionitril einsetzt.

22. Verfahren gemäss den Ansprüchen 9 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass man das Amid bzw. die das Amid enthaltende Lösung von den Zellen der Biomasse trennt und das Amid zu der entsprechenden Säure verseift.
- 5 23. Verfahren gemäss den Ansprüchen 9 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass man das Amid bzw. die das Amid enthaltende Lösung von den Zellen der Biomasse trennt und das Amid mit Alkali- oder Erdalkalimetallhydroxiden zu den Salzen der 10 entsprechenden Carbonsäuren verseift.
24. Verfahren gemäss Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass man MHA-Amid mit Calciumhydroxid verseift und das Calciumsalz gewinnt.
25. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 15, wobei man
- 20 a) Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* fermentiert, in denen man isolierte Polynukleotide, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren, die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den in den Sequenzen mit den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 25 enthaltenden Aminosäuresequenzen, wobei die Polypeptide die Aktivität einer cyanidtoleranten Nitrilhydratase besitzen, verstärkt, insbesondere rekombinant überexprimiert,
- 30 b) aus diesen Mikroorganismen das rekombinant erzeugte Enzym mit Nitrilhydrataseaktivität gegebenenfalls isoliert oder eine dieses Enzym enthaltende Proteinfraktion herstellt, und c) die Mikroorganismen gemäss a) oder das Enzym oder die dieses enthaltende Fraktion gemäss b) in ein Medium überführt, das eine Nitrilgruppen-haltige

Verbindung der allgemeinen Formeln (I) oder (II) enthält.

26. Verfahren gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 24, wobei man Wirtszellen gemäss den Ansprüchen 7 oder 8 einsetzt.  
5
27. Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276.
28. Cyanidtolerante Nitrilhydratasen, isoliert aus den Stämmen der Gattung *Pseudonomas*, hinterlegt unter den 10 Nummern DSM 16275 und DSM 16276.

Abbildung 1

MA32

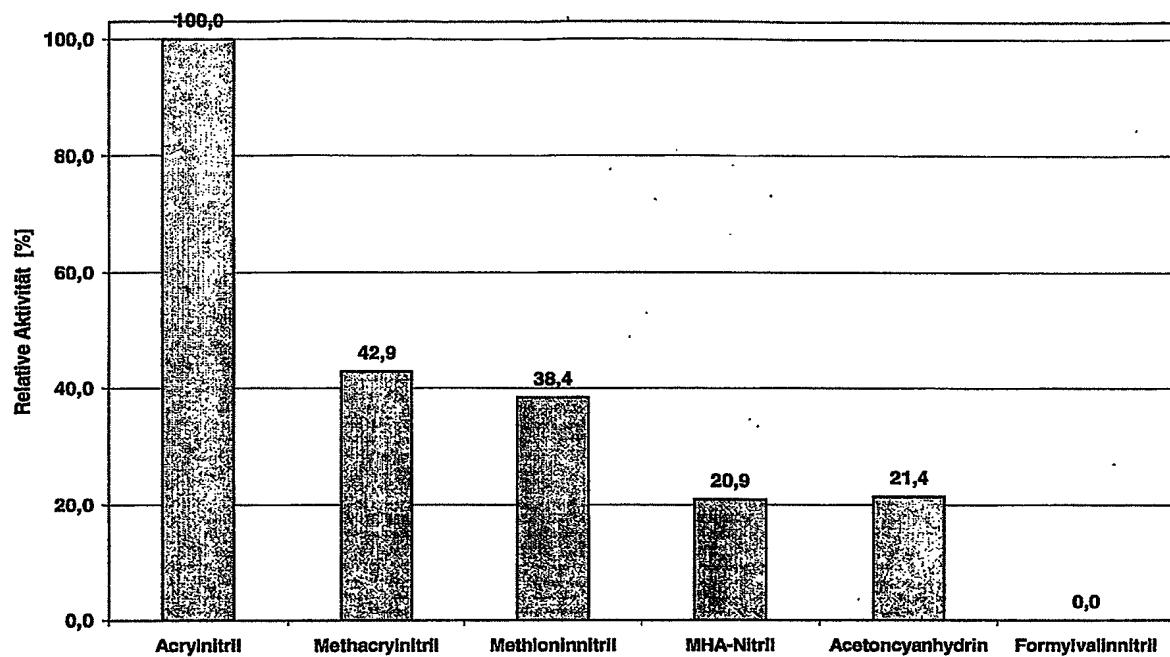


Abbildung 2

MA113

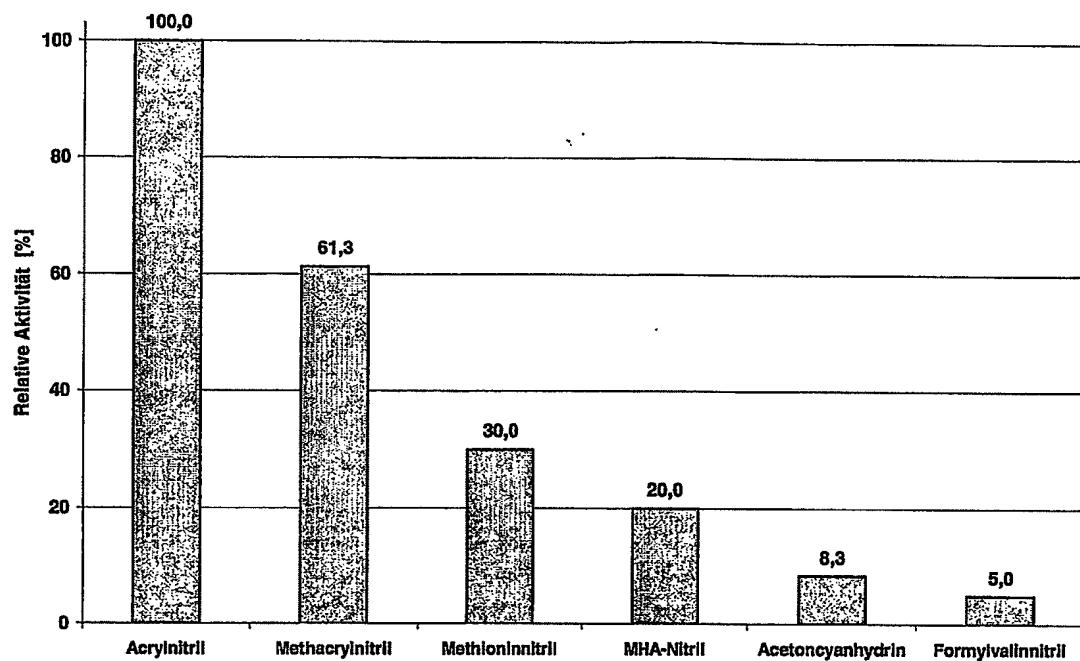


Abbildung 3

MA31

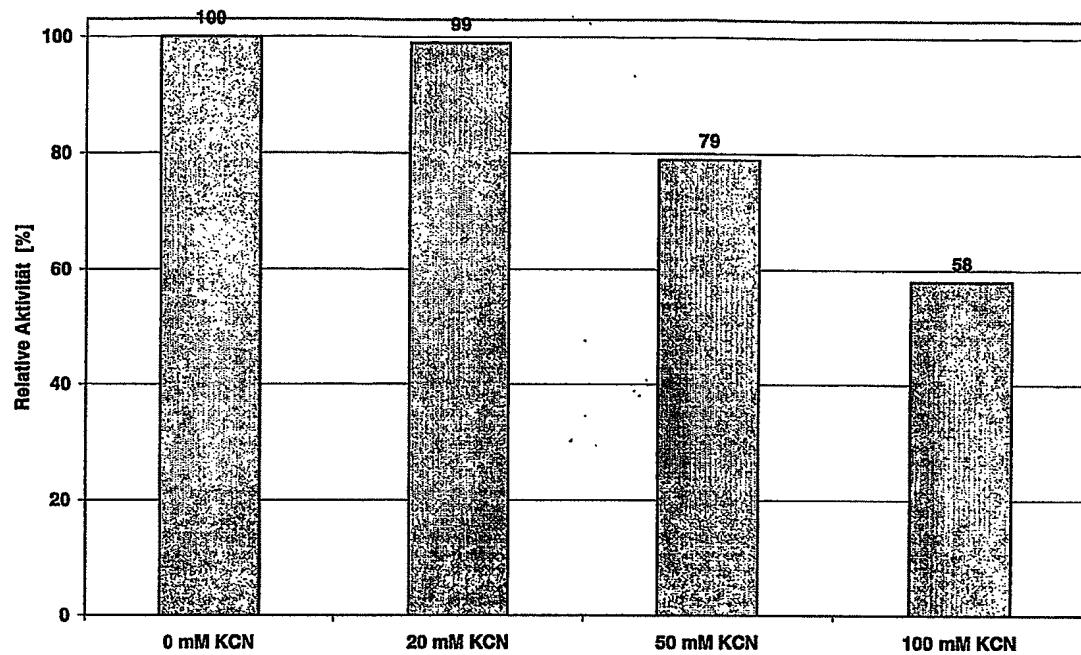


Abbildung 4

MA113

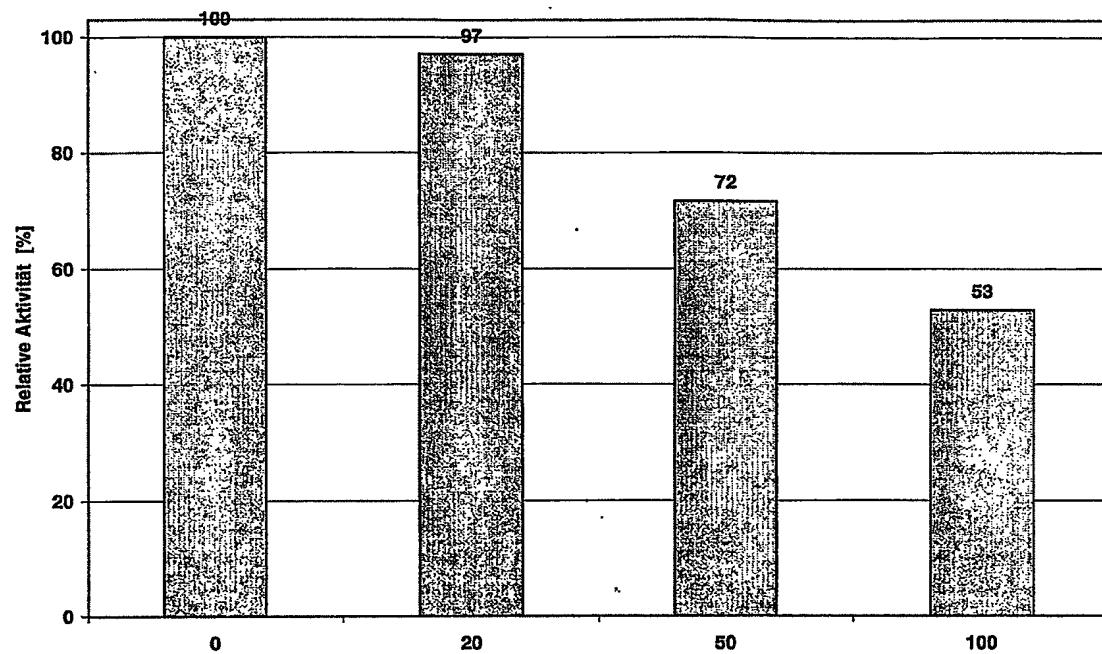


Abbildung 5

MA113

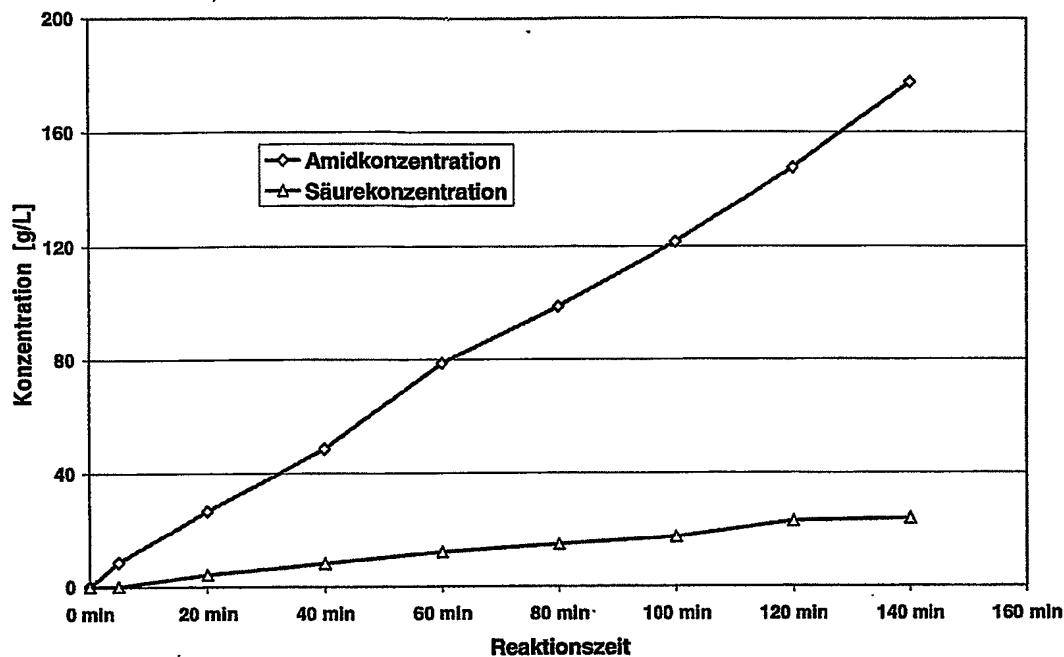
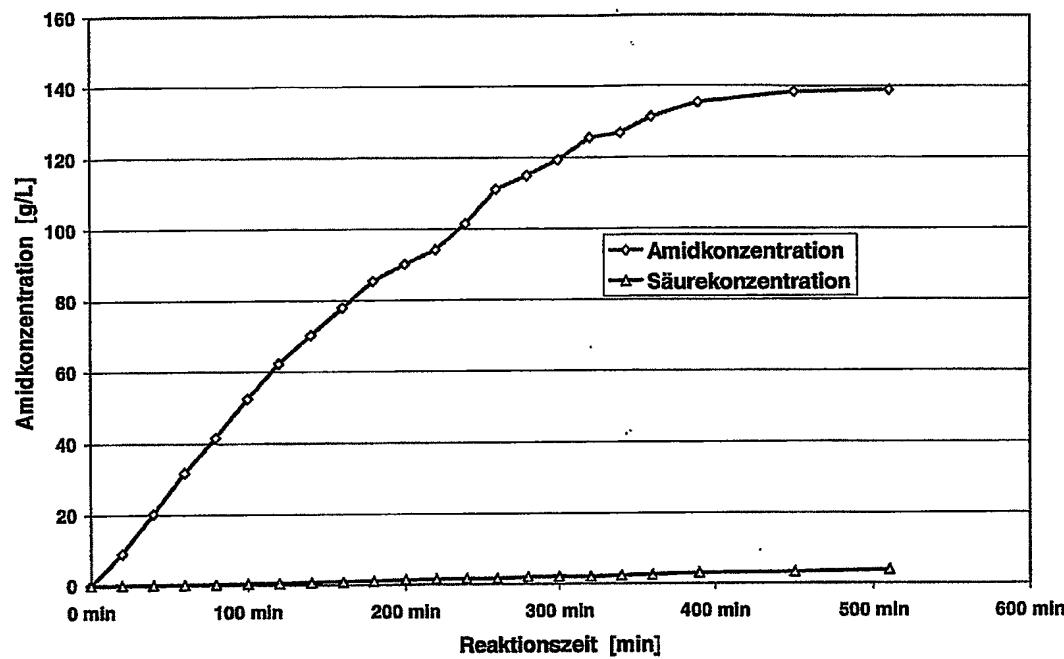
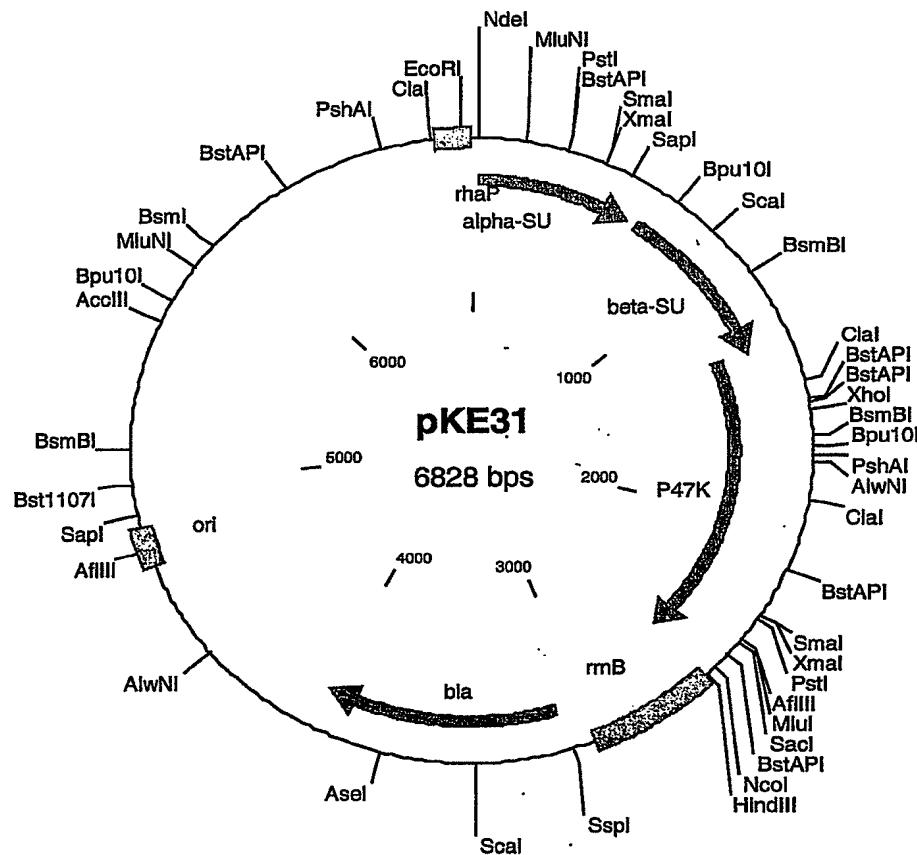


Abbildung 6

MA32



### Abbildung 7



## SEQUENCE LISTING

<110> Degussa AG  
 5 <120> Cyanidtolerante Nitrilhydratasen.  
 <130> 040061  
 10 <160> 14  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 6828  
 15 <212> DNA  
 <213> Pseudomonas marginalis

20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (25)..(609)  
 <223> Gen der Kodierregion der alpha-Untereinheit

25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (650)..(1312)  
 <223> Gen der Kodierregion der beta-Untereinheit

30 <220>  
 <221> gene  
 <222> (1309)..(2577)  
 <223> Gen des Aktivatorproteins

35 <400> 1  
 aattcttaag aaggagatat acat atg agt aca gct act tca acg ccc ggc 51  
 Met Ser Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly  
 1 5

40 gaa aga gcc tgg gca ttg ttt caa gtc ctc aag agc aag gaa ctc atc 99  
 Glu Arg Ala Trp Ala Leu Phe Gln Val Leu Lys Ser Lys Glu Leu Ile  
 10 15 20 25

45 ccg gag ggc tat gtc gag cag ctc acg caa ttg atg gag cac ggc tgg 147  
 Pro Glu Gly Tyr Val Glu Gln Leu Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp  
 30 35 40

50 agc ccc gag aac ggc gcc cgt gtg gtg gcc aag gcg tgg gtc gat ccg 195  
 Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Val Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro  
 45 50 55

55 cag ttc cgg gca ctg ttg ctc aag gac ggc acc gcg gcc tgc gcc cag 243  
 Gln Phe Arg Ala Leu Leu Lys Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln  
 60 65 70

60 ttc ggc tac acc ggc ccc cag ggc gaa tac atc gtt ggc ctg gag gat 291  
 Phe Gly Tyr Thr Gly Pro Gln Gly Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp  
 75 80 85

acg ccg acg ctg aag aac gtg att gtc tgc agc ctg tgc tcc tgc acc 339  
 Thr Pro Thr Leu Lys Asn Val Ile Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr  
 90 95 100 105

	aac tgg ccg gtc ctc ggc ctg cca ccg gag tgg tac aag ggt ttc gag Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu 110 115. 120	387
5	ttc cgc gca cgc ctg gtc cgg gag ggg cgc acg gta ctg cgc gag ctg Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu 125 130 135	435
10	ggg acg gag ttg ccc cgg gac atg gtg gtc aag gtc tgg gac acc agc Gly Thr Glu Leu Pro Arg Asp Met Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser 140 145 150	483
15	gcc gaa agc cgc tac ctg gtg ctg cgg gtc agg ccc gaa ggc tca gaa Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu Pro Val Arg Pro Glu Gly Ser Glu 155 160 165	531
20	cac atg agc gaa gag cag ctt caa gcg ctg gtg acc aaa gac gtg ctg His Met Ser Glu Glu Gln Leu Gln Ala Leu Val Thr Lys Asp Val Leu 170 175 180 185	579
25	atc ggc gtc gcc ctg ccc cgc gtg ggc tga gaacaacacc tcatcatcgt Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val Gly 190	629
30	tcactccgg agtttgatt atg gat ggc ttt cac gat ctc ggc ggt ttc caa Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln 195 200 205	682
35	ggc ttt gga aaa gtc cct cac acc atc aac agc ctg agc tac aaa cag Gly Phe Gly Lys Val Pro His Thr Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln 210 215 220	730
40	gtg ttc aag cag gac tgg gag cat ctg gcc tac agc ttg atg ttc atc Val Phe Lys Gln Asp Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile 225 230 235	778
45	ggt gcc gac cac ttg aaa aag ttc agc gtg gac gaa gtg cgt cac gcc Gly Ala Asp His Leu Lys Phe Ser Val Asp Glu Val Arg His Ala 240 245 250	826
50	gtc gaa cgc ctg gat gtg cgc cag cat gtc ggc acc cag tac tac gaa Val Glu Arg Leu Asp Val Arg Gln His Val Gly Thr Gln Tyr Tyr Glu 255 260 265	874
55	cgc tac gtc atc gcg acc gcc acc ctg ctg gtc gaa acc ggc gtg atc Arg Tyr Val Ile Ala Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile 270 275 280 285	922
	acc cag gcg gag ctt gat cag gcc ttg ggc tcc cac ttc aag ctg gcg Thr Gln Ala Glu Leu Asp Gln Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala 290 295 300	970
	aat ccc gcc cat gcc gag ggc cgc ccg gcg att acg ggg cgg ccg ccc Asn Pro Ala His Ala Glu Gly Arg Pro Ala Ile Thr Gly Arg Pro Pro 305 310 315	1018
	ttc gag gtg ggg gat cgg gtg gtg cga gac gaa tat gtg gct gga Phe Glu Val Gly Asp Arg Val Val Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly 320 325 330	1066

	cac atc cgc atg ccc gcc tac gtg cgc ggc aag gaa ggc gtg gtc ctg His Ile Arg Met Pro Ala Tyr Val Arg Gly Lys Glu Gly Val Val Leu 335 340 345	1114
5	cac cgc acg tca gag aaa tgg ccg ttc ccc gac gca atc ggg cat ggc His Arg Thr Ser Glu Lys Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly 350 355 360 365	1162
10	gat gta agc gca gcc cat caa ccc acc tac cac gtc gag ttc gcc gtg Asp Val Ser Ala Ala His Gln Pro Thr Tyr His Val Glu Phe Ala Val 370 375 380	1210
15	aag gac ctg tgg gga gat gcc gcc gat gag ggt ttt gtg gtg gtc gac Lys Asp Leu Trp Gly Asp Ala Ala Asp Glu Gly Phe Val Val Asp 385 390 395	1258
20	ctg ttc gaa agc tac ctg gac aag gcc gcc ggc gcg cgc gcg gtg aac Leu Phe Glu Ser Tyr Leu Asp Lys Ala Ala Gly Ala Arg Ala Val Asn 400 405 410	1306
	cca tga cagacggcgc ccaggcaagc cgactgccgg tgacggctt ttcgggcttc Pro	1362
25	ctcggcgccg gcaagaccac cctgctcaac cacatcctgc gcaatcgca aggcctgccc gtggccgtca tcgtcaatga catgagcgaa gtcaatatacg atgccaaga ggtgcagcgc	1422 1482
30	gatgtcgccgc tgcaccgtgg tcgcgatgag ctgatcgaga tgagcaacgg gtgcatctgc tgcaccctgc ggcggattt gctcgagcag atcagcatgc tcgcacgcca acagcgtttc	1542 1602
35	gattacctgc tgattgaatc cacggggatc tccgagccga tgccggctgc ggagacgttc gccttccttg acgctgatgg cttcagcctc agcgaactgg cgccgcctgga caccttggtg	1662 1722
	acgggtggtcg atggcagtcg tttccaggaa ctgctcgaat cggccacac cgttgaccag	1782
40	gatgacgcca cggcagacgc acccaagcgc cacctggccg atctgctgat cgaacaggtg gagtacgcca acgtcattct cgtcaataag ctggatctga tcgatgcagc gcagtatcag	1842 1902
45	gcgcgtgcagg cgatccctcac aggccttaac cggacggcgc ggatcatgcc gatggcccac ggtaacatcc catcagccag cctgctcggc acccatctgt ttgatttacc cagcctcgcc	1962 2022
	gcgtcgccgg gctggatgag gaaaatggag gggcagacgc cggccgcctc cgagtcggac	2082
50	acctatggcg tgacgtcctg ggtgtaccgt gagcgcgcac cttccaccc gcaacggttg ctcgacttcc tccagcagcc ctggtgcaac gggcggttgc tgccgagccaa aggttacttc	2142 2202
55	tggcttgcca gcccacact gaaaacggc ctgctggtgc aaagcggcaa ggggttccag tgggactatg tcggccgctg gtggacttcc atcgagccgt cgcaatggcc cggggacgaa	2262 2322
	tacccggctgc agggcatcag gccaaatgg gacagcgtgg tcggcgactg cggcaggag	2382
60	ttggtgttta tcggccaggg cctcgacacc gacgcgttac agcgcgagct cgaccactgc ctgctgagcg cccagggaaat cggccggc ccaactggct ggcaagcgct gccaggggcg	2442 2502

	accgcctttg accgacagac cttgccccgc ccccccacaca gcccatggcg attgccccca	2562
5	tttgatccga gatagaagct tctgttttgg cggtatggag aagatttca gcctgataca	2622
	gattaaatca gaacgcagaa gccgtctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagttagcgc	2682
	ggtgtccca cctgacccca tgccgaactc agaagtgaaa cgccgtagcg ccgatggtag	2742
10	tgtgggtct ccccatgcga gagtagggaa ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc	2802
	agtcgaaaga ctgggcctt cgtttatct gttgttgtc ggtgaacgct ctctgagta	2862
15	ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg ttgcgaagca acggcccgga gggtggcggg	2922
	caggacgccc gccataaaact gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc ctgacggatg	2982
	gccttttgc gtttctacaa actctttgt ttattttct aaatacattc aaatatgtat	3042
20	ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg	3102
	agtattcaac atttccgtgt cgccttatt cccttttg cggcattttg cttcctgtt	3162
25	tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggcacgaa	3222
	gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtttagatcc ttgagagttt tcgccccaa	3282
	gaacgttttcaatgtatgag cacttttaaa gttctgtat gtggcgccgtt attatccgt	3342
30	gttgacgccc ggcaagagca actcggtcgc cgcataactt attctcagaa tgacttggtt	3402
	gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc	3462
35	agtgcgtcca taaccatgag tgataaacact gcggccaact tactctgac aacgatcgga	3522
	ggaccgaagg agctaaccgc tttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat	3582
	cggtggaaac cggagctgaa tgaagccata ccaaaccgacg agcgtgacac cacgatgcct	3642
40	gtagcaatgg caacaacggtt ggcacaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc	3702
	cggtacaaat taatagactg gatggaggcg gataaagttt caggaccact tctgcgtcg	3762
45	gccttcgg ctggctggtt tattgtat aatctggag ccgggtgagcg tgggtctcgc	3822
	ggtatcattt cagcaactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg	3882
	acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca	3942
50	ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta	4002
	aaacttcatt tttttttttt aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc	4062
55	aaaatccctt aacgtgagtt ttgcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa	4122
	ggatcttctt gagatccctt tttttgcgc gtaatctgct gcttgcacaa aaaaaaaacca	4182
	cgcgttccac cgggtggtttgcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa	4242
60	aotggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccctt tagtgttagcc gtagttaggc	4302
	caccacttca agaactctgt agcaccgcct acataacctcg ctctgctaat cctgttacca	4362

	gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta	4422
5	ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggtgttgt gcacacagcc cagcttggag	4482
	cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt	4542
	cccgaaaggga gaaaggcggga caggtatccg gtaagcggca ggtcggaac aggagagcgc	4602
10	acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatcttata gtcctgtcgg gtttcggcac	4662
	ctctgacttg agcgtcgatt ttgtgtatgc tcgtcaggggg ggcggagcct atggaaaaac	4722
15	gccagcaacg cggcctttt acggttcctg gcctttgct ggccctttgc tcacatgttc	4782
	tttcctgcgt tatccccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgccttga gtgagctgat	4842
	accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaaagag	4902
20	cgcctgatgc ggtatttct ccttacgcatt ctgtcggttgc ttccacacccg catatatgg	4962
	gcactctcag tacaatctgc tctgatcccg catagtaag ccagtataca ctccgctatc	5022
25	gctacgtgac tgggtcatgg ctgcgccccg acaccggcca acaccggctg acgcgcctg	5082
	acgggcttgc ctgcctccgg catccgccta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg	5142
	catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcaagtcg ggtaaagctc	5202
30	atcagcgtgg tcgtgaagcg attcacagat gtctgcctgt tcatccgcgt ccagctcggt	5262
	gagtttctcc agaagcgtta atgtctggct tctgatcaaag cggccatgt taagggcggt	5322
35	ttttcctgt ttggtcactt gatgcctccg tgtaaggggg aatttctgtt catggggta	5382
	atgataccga taaaacgaga gaggatgctc acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc	5442
	cggttactgg aacgttgcgtt gggtaaaacaa ctggcggtat ggatgcggcg ggaccagaga	5502
40	aaaatcactc agggtaatgc coagcgcttc gttataacag atgttaggtgt tccacagggt	5562
	agccagcagc atcctgcgtat gcagatccgg aacataatgg tgcaaggcgc tgacttccgc	5622
45	gtttccagac ttacgaaac acggaaacccg aagaccattc atgttgttgc tcaggtcgca	5682
	gacgtttgc agcagcagtc gttcacgtt cgctcgctt tcgggtattt attctgctaa	5742
	ccagtaaggc aacccggcca gcttagccgg gtcctcaacg acaggagcac gatcatgcgc	5802
50	acccgtggcc aggacccaac gctgcccggat atgcggcgatc tgccggctgtt ggagatggcg	5862
	gacgcgtatgg atatgttctg ccaagggttg gtttgcgtat tcacagttctt ccgcaagaat	5922
55	tgattggctc caatttttgg agtgggtgaat ccgttagcga ggtgcggcccg gtttccattc	5982
	aggtcgaggt ggccggctc catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggatata	6042
	gggcggcgatc cttacaatcc atgccaaccc gttccatgtt ctcggcgagg cggcataaat	6102
60	cgccgtgacg atcagcggtc cagtgtatgcg agttaggtgt gtaagagccg cgagcgatcc	6162
	ttgaagctgt ccctgtatggt cgtcatctac ctgcctggac agcatggctt gcaacgcggg	6222

	catcccgatg ccgcccgaag cgagaagaat cataatgggg aaggccatcc agcctcgct	6282
5	cgcgaacgcc agcaagacgt agcccgacgc gtcggccgca atgccggcga taatggcctg	6342
	cttctcgccg aaacgtttgg tggcgggacc agtgacgaag gcttgagcga gggcgtgcaa	6402
	gattccgaat accgcaagcg acaggccat catcgctcg ctccagcgaa agcggtcctc	6462
10	gccgaaaatg acccagagcg ctgccggcac ctgtcctacg agttgcatga taaagaagac	6522
	agtcataagt gcggcgacga tagtcatgcc cgcgcacccac cggaaggagc tgactgggtt	6582
15	gaaggctctc aagggcatcg gtcgacgctc tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca	6642
	gcccagtagt aggttggggc cgttgagcac cgccgcgcga aggaatggtg catgcatcga	6702
	tcaccacaat tcagcaaatt gtgaacatca tcacgttcat cttccctgg ttgccaatgg	6762
20	cccatttcc tgtcagtaac gagaaggctcg cgaattcagg cgcttttag actggtcgta	6822
	atgaac	6828
25	<210> 2	
	<211> 194	
	<212> PRT	
	<213> <i>Pseudomonas marginalis</i>	
30	<400> 2	
	Met Ser Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Trp Ala Leu Phe	
	1 5 10 15	
35	Gln Val Leu Lys Ser Lys Glu Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Val Glu Gln	
	20 25 30	
40	Leu Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg	
	35 40 45	
45	Val Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Ala Leu Leu Leu	
	50 55 60	
50	Lys Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Tyr Thr Gly Pro Gln	
	65 70 75 80	
55	Gly Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Thr Leu Lys Asn Val	
	85 90 95	
	Ile Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu	
	100 105 110	
60	Pro Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg	
	115 120 125	

Glu Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Arg Asp  
 130 135 140

5 Met Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val  
 145 150 155 160

10 Leu Pro Val Arg Pro Glu Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu  
 165 170 175

15 Gln Ala Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg  
 180 185 190

20 Val Gly

25 <210> 3  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 25 <213> *Pseudomonas marginalis*

30 <400> 3

Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln Gly Phe Gly Lys Val  
 30 1 5 10 15

35 Pro His Thr Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp  
 20 25 30

Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Ala Asp His Leu  
 35 40 45

40 Lys Lys Phe Ser Val Asp Glu Val Arg His Ala Val Glu Arg Leu Asp  
 50 55 60

45 Val Arg Gln His Val Gly Thr Gln Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala  
 65 70 75 80

50 Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu  
 85 90 95

55 Asp Gln Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala  
 100 105 110

60 Glu Gly Arg Pro Ala Ile Thr Gly Arg Pro Pro Phe Glu Val Gly Asp  
 115 120 125

Arg Val Val Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Ile Arg Met Pro  
 130 135 140

Ala Tyr Val Arg Gly Lys Glu Gly Val Val Leu His Arg Thr Ser Glu  
 145 150 155 160  
 5

Lys Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Asp Val Ser Ala Ala  
 165 170 175

10 His Gln Pro Thr Tyr His Val Glu Phe Ala Val Lys Asp Leu Trp Gly  
 180 185 190

15 Asp Ala Ala Asp Glu Gly Phe Val Val Val Asp Leu Phe Glu Ser Tyr  
 195 200 205

20 Leu Asp Lys Ala Ala Gly Ala Arg Ala Val Asn Pro  
 210 215 220

25 <210> 4  
 <211> 1269  
 <212> DNA  
 <213> *Pseudomonas marginalis*

30 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(1269)  
 <223> Gen der Kodierregion des Aktivatorproteins

35 <400> 4  
 atg aca gac ggc gcc cag gca agc cga ctg ccg gtg acg gtc ctt tcg  
 Met Thr Asp Gly Ala Gln Ala Ser Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser  
 1 5 10 15

40 ggc ttc ctc ggc gcc aag acc acc ctg ctc aac cac atc ctg cgc  
 Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg  
 20 25 30

45 aat cgc gaa ggc ctg cgc gtg gcc gtc atc gtc aat gac atg agc gaa  
 Asn Arg Glu Gly Leu Arg Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu  
 35 40 45

50 gtc aat atc gat gcc gaa gag gtg cag cgc gat gtc gcg ctg cac cgt  
 Val Asn Ile Asp Ala Glu Val Gln Arg Asp Val Ala Leu His Arg  
 50 55 60

55 ggt cgc gat gag ctg atc gag atg agc aac ggg tgc atc tgc tgc acc  
 Gly Arg Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr  
 65 70 75 80

60 ctg cgc gcc gat ttg ctc gag cag atc agc atg ctc gca cgc caa cag  
 Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Met Leu Ala Arg Gln Gln  
 85 90 95

cgt ttc gat tac ctg ctg att gaa tcc acg ggg atc tcc gag ccg atg  
 Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met  
 100 105 110

	ccg gtc gcg gag acg ttc gcc ttc ctt gac gct gat ggc ttc agc ctc	384
	Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asp Gly Phe Ser Leu	
	115 120 125	
5	agc gaa ctg gcg cgc ctg gac acc ttg gtg acg gtg gtc gat ggc agt	432
	Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Gly Ser	
	130 135 140	
10	cgt ttc cag gaa ctg ctc gaa tcg ccg cac acc gtt gac cag gat gac	480
	Arg Phe Gln Glu Leu Leu Glu Ser Pro His Thr Val Asp Gln Asp Asp	
	145 150 155 160	
15	gcc acg cca gac gca ccc aag cgc cac ctg gcc gat ctg ctg atc gaa	528
	Ala Thr Pro Asp Ala Pro Lys Arg His Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu	
	165 170 175	
	cag gtg gag tac gcc aac gtc att ctc gtc aat aag ctg gat ctg atc	576
	Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Leu Asp Leu Ile	
	180 185 190	
20	gat gca gcg cag tat cag gcc gtg cag gcg atc ctc aca ggc ctt aac	624
	Asp Ala Ala Gln Tyr Gln Ala Val Gln Ala Ile Leu Thr Gly Leu Asn	
	195 200 205	
25	ccg acg gcg cgg atc atg ccg atg gcc cac ggt aac atc cca tca gcc	672
	Pro Thr Ala Arg Ile Met Pro Met Ala His Gly Asn Ile Pro Ser Ala	
	210 215 220	
30	agc ctg ctc ggc acc cat ctg ttt gat tta ccc agc ctc gcg gcg tcg	720
	Ser Leu Leu Gly Thr His Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ser	
	225 230 235 240	
35	ccg ggc tgg atg cgg aaa atg gag gcg gca gac gcg ccg gcc tcc gag	768
	Pro Gly Trp Met Arg Lys Met Glu Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ser Glu	
	245 250 255	
	tcg gac acc tat ggc gtg acg tcc tgg gtg tac cgt gag cgc gca cct	816
	Ser Asp Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Glu Arg Ala Pro	
	260 265 270	
40	ttc cac ccg caa cgg ttg ctc gac ttt ctc cag cag ccc tgg tgc aac	864
	Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Gln Gln Pro Trp Cys Asn	
	275 280 285	
45	ggg cgg ttg ctg cgc agc aaa ggt tac ttc tgg ctt gcc agc cgc cac	912
	Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His	
	290 295 300	
50	ctg gaa acc ggc ctg ctg gtg caa agc ggc aag cgg ttc cag tgg gac	960
	Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Gln Ser Gly Lys Arg Phe Gln Trp Asp	
	305 310 315 320	
55	tat gtc ggg cgc tgg tgg aac ttc atc gag cgg tcg caa tgg ccc cgg	1008
	Tyr Val Gly Arg Trp Trp Asn Phe Ile Glu Pro Ser Gln Trp Pro Arg	
	325 330 335	
	gac gaa tac cgg ctg cag ggc atc agg gcc aaa tgg gac agc gtg gtc	1056
	Asp Glu Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Arg Ala Lys Trp Asp Ser Val Val	
	340 345 350	

	ggc gac tgc cgg cag gag ttg gtg ttt atc ggc cag ggc ctc gac acc	1104
	Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Val Phe Ile Gly Gln Gly Leu Asp Thr	
5	355 360 365	
	gac gcg tta cag cgc gag ctc gac cac tgc ctg agc gcc cag gaa	1152
	Asp Ala Leu Gln Arg Glu Ileu Asp His Cys Leu Leu Ser Ala Gln Glu	
	370 375 380	
10	atc gcc gcc ggc cca ctg gcc tgg caa gcg ctg cca ggg ggc acc gcc	1200
	Ile Ala Ala Gly Pro Leu Ala Trp Gln Ala Leu Pro Gly Ala Thr Ala	
	385 390 395 400	
15	ttt gac cga cag acc ctt gcc cgc ccc cca cac agc cca tgg cga ttg	1248
	Phe Asp Arg Gln Thr Leu Ala Arg Pro Pro His Ser Pro Trp Arg Leu	
	405 410 415	
20	ccc cca ttt gat ccg aga tag	1269
	Pro Pro Phe Asp Pro Arg	
	420	
25	<210> 5	
	<211> 422	
	<212> PRT	
	<213> Pseudomonas marginalis	
	<400> 5	
30	Met Thr Asp Gly Ala Gln Ala Ser Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser	
	1 5 10 15	
35	Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg	
	20 25 30	
40	Asn Arg Glu Gly Leu Arg Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu	
	35 40 45	
	Val Asn Ile Asp Ala Glu Val Gln Arg Asp Val Ala Leu His Arg	
	50 55 60	
45	Gly Arg Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr	
	65 70 75 80	
50	Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Met Leu Ala Arg Gln Gln	
	85 90 95	
55	Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met	
	100 105 110	
60	Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asp Gly Phe Ser Leu	
	115 120 125	

Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Gly Ser  
130 135 140

5 Arg Phe Gln Glu Leu Leu Glu Ser Pro His Thr Val Asp Gln Asp Asp  
145 150 155 160

10 Ala Thr Pro Asp Ala Pro Lys Arg His Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu  
165 170 175

15 Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Leu Asp Leu Ile  
180 185 190

20 Asp Ala Ala Gln Tyr Gln Ala Val Gln Ala Ile Leu Thr Gly Leu Asn  
195 200 205

25 Pro Thr Ala Arg Ile Met Pro Met Ala His Gly Asn Ile Pro Ser Ala  
210 215 220

30 Ser Leu Leu Gly Thr His Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ser  
225 230 235 240

35 Pro Gly Trp Met Arg Lys Met Glu Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ser Glu  
245 250 255

40 Ser Asp Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Glu Arg Ala Pro  
260 265 270

45 Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Gln Gln Pro Trp Cys Asn  
275 280 285

50 Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His  
290 295 300

55 Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Gln Ser Gly Lys Arg Phe Gln Trp Asp  
305 310 315 320

60 Tyr Val Gly Arg Trp Trp Asn Phe Ile Glu Pro Ser Gln Trp Pro Arg  
325 330 335

Asp Glu Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Arg Ala Lys Trp Asp Ser Val Val  
340 345 350

Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Val Phe Ile Gly Gln Gly Leu Asp Thr  
355 360 365

65 Asp Ala Leu Gln Arg Glu Leu Asp His Cys Leu Leu Ser Ala Gln Glu  
370 375 380

Ile Ala Ala Gly Pro Leu Ala Trp Gln Ala Leu Pro Gly Ala Thr Ala  
 385 390 395 400

5 Phe Asp Arg Gln Thr Leu Ala Arg Pro Pro His Ser Pro Trp Arg Leu  
 405 410 415

10 Pro Pro Phe Asp Pro Arg  
 420

15 <210> 6  
 <211> 2371  
 <212> DNA  
 <213> Pseudomonas putida

20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(582)  
 <223> Gen der Kodierregion der alpha-Untereinheit

25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (624)..(1286)  
 <223> Gen der Kodierregion der beta-Untereinheit

30 <220>  
 <221> gene  
 <222> (1283)..(2371)  
 <223> Gen des Aktivatorproteins

35 <400> 6  
 atg acg gca act tca acc cct ggt gag cgg gca cgc gca ttg ttt gca 48  
 Met Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Arg Ala Leu Phe Ala  
 1 5 10 15

40 gtg ctc aag cgc aaa gac ctc atc ccc gag ggc tac atc gaa cag ctc 96  
 Val Leu Lys Arg Lys Asp Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Ile Glu Gln Leu  
 20 25 30

45 acc cag ctg atg gaa cac ggc tgg agc ccg gaa aac ggc ggc cgc atc 144  
 Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Ile  
 35 40 45

50 gtc gcc aag gcc tgg gtc gat ccg cag ttt cgc gag ctg ctg ctc aag 192  
 Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Glu Leu Leu Lys  
 50 55 60

55 gac ggt acg gcc gcc tgc gcc cag ttc ggc ttc acc ggc cca caa ggc 240  
 Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Phe Thr Gly Pro Gln Gly  
 65 70 75 80

60 gtc tgt agc ctg tgc tcc tgc acg aac tgg ccg gtg ctg ggc ctg cca 336  
 Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro  
 100 105 110

	cct gag tgg tac aag ggc ttc gag ttc cgt gcg cgg ttg gtc cgg gag	384
	Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu	
	115 120 125	
5	ggg cgc acg gta ttg cgc gag ctg ggc acc gag ttg ccc ggc gac atg	432
	Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Gly Asp Met	
	130 135 140	
10	gtg gtc aag gtc tgg gac acc agc gct gaa agc cgc tac ctg gtg ctg	480
	Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu	
	145 150 155 160	
15	ccg caa cga cca gcg ggc tca gag cat atg agc gaa gag cag ttg cgg	528
	Pro Gln Arg Pro Ala Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu Arg	
	165 170 175	
20	caa ctg gtc acc aag gac gtg ctg atc ggc gtc gcc ctg ccc cgc gtt	576
	Gln Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val	
	180 185 190	
25	ggc tga gcaaggccgc ccaacccat tcaacttccg gagtgttcaa t atg gat ggc	632
	Gly Met Asp Gly	
	195	
30	atc aac agc ctg agc tac aag cag gtg ttc aag cag gac tgg gaa cac	728
	Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp Trp Glu His	
	215 220 225	
35	ctg gcc tac agc ctg atg ttc atc ggc gtc gac cac ctg aac aag ttc	776
	Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Val Asp His Leu Asn Lys Phe	
	230 235 240	
40	agc gtc gac gaa ata cgt cat gcc gtc gaa cgc att gac gtg cgc cag	824
	Ser Val Asp Glu Ile Arg His Ala Val Glu Arg Ile Asp Val Arg Gln	
	245 250 255 260	
45	cac gtc ggc acc gaa tac tac gaa cgt tat gtg atc gcc act gcc acg	872
	His Val Gly Thr Glu Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala Thr Ala Thr	
	265 270 275	
50	ctg ctg gtc gaa aca ggc gtc atc acc cag gcc gaa ctg gat gaa gca	920
	Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu Asp Glu Ala	
	280 285 290	
55	ctc ggc tcg cac ttc aag ctg gcc aac ccc gcc cat gcg caa ggg cgt	968
	Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala Gln Gly Arg	
	295 300 305	
60	gct gca att atc ggg cga gcg cct ttt gaa gtg ggc gat cgg gtc atc	1016
	Ala Ala Ile Ile Gly Arg Ala Pro Phe Glu Val Gly Asp Arg Val Ile	
	310 315 320	
	gta cgc gat gaa tac gtg gcc ggg cat gtg cgc atg cct gca tac gtg	1064
	Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Val Arg Met Pro Ala Tyr Val	
	325 330 335 340	

	cgc ggc aag caa ggc gta gtg ctg cac cgg acc act gaa cag tgg ccg Arg Gly Lys Gln Gly Val Val Leu His Arg Thr Thr Glu Gln Trp Pro 345 350 355	1112
5	ttt ccg gac gcg att ggc cat ggc gac cag agc gct gcg cat caa ccg Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Asp Gln Ser Ala Ala His Gln Pro 360 365 370	1160
10	acc tac cat gtc gag ttc cgc gtg cggtt gac ctg tgg ggc gat gcc gca Thr Tyr His Val Glu Phe Arg Val Arg Asp Leu Trp Gly Asp Ala Ala 375 380 385	1208
15	gac gac ggc ctg gtg gta gac ctg ttc gaa agc tat ctg gac agg Asp Asp Gly Leu Val Val Asp Leu Phe Glu Ser Tyr Leu Asp Arg 390 395 400	1256
20	gtc gaa agc ccg cga gtg gtg cgc gca tga gtgccggcgc ccaggcaggg Val Glu Ser Pro Arg Val Val Arg Ala 405 410	1306
25	cggtgtccgg tgacgggtttc ttcaaggcttc ctccggcgac gcaagaccac cctgctcaac cacatcctgc gcaaccgcca gggcctgaag gtggcggtta tcgtcaatga catgagcgag	1366 1426
30	gtcaacatcg atgcccggca ggtccagcgc gacgttgcgc tgtatcgtgg ccaggatgaa ttgatagaga tgagcaacgg ctgtatctgc tgcacccctgc ggcggacact gcttgagcag atcagcgcgc tggcgccca gcagcgtttc gattacctgt tgatcgagtc caccgggatt tccgagccga tgccagtcgc cgagaccttt gcctttctcg acgccaacgg tttcagcctc agcgaactgg cgccggctgga tacgctggtg acggtggtcg atgcccggca gttcatggcc	1486 1546 1606 1666 1726
35	atgctcgact ctcccgaaac cgtcgccgg gccgacgtca ccacggatga cagcaggcgc ccgctggccg atctgctgat cgagcaggtc gagtatgcca atgtgattct ggtcaacaaa cgcgacctgg tcgadgaggc gcagttaccag gcccgtcagg cagttctcgc cgggctcaat	1786 1846 1906
40	ccaggcgcac agatcctgcc gatgggtggcc ggcaacgtcg ccctgtcgag cgtccttggt acccagctgt tcgatttgcc cagccttgcc gcagcggcccg gctggatgaa acagatggac	1966 2026
45	gcgcacgaca ccccgccgg cgagtcgcag acctatggcg tgacgtcatg ggtgtaccga gccccggccccc cgttccatcc gcaacgcttg cttgattttc tcgccccggcc ctggcgccac	2086 2146
50	ggccgttcc tcgacgcaaa aggttatttc tggcttgcca gcccggccaccc cgaaatcggc ttgctggtaa acagcggcca gcagttcaa tggactatg ttggccattg gtggacttc atcgacacgt cacagtggcc acaggacaag tatcgcttgc agggcatcat ggccaagtgg	2206 2266 2326
55	55 gacagcatcg taggcgactg ccgacaggag ctgaaaagct tatga	2371
	<210> 7	
	<211> 193	
60	<212> PRT	
	<213> Pseudomonas putida	

<400> 7

Met Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Arg Ala Leu Phe Ala  
1 5 10 15

5 Val Leu Lys Arg Lys Asp Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Ile Glu Gln Leu  
20 25 30

10 Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Ile  
35 40 45

15 Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Glu Leu Leu Lys  
50 55 60

20 Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Phe Thr Gly Pro Gln Gly  
65 70 75 80

25 Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Gln Leu Lys Asn Val Ile  
85 90 95

30 Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro  
100 105 110

35 Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu  
115 120 125

40 Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Gly Asp Met  
130 135 140

45 Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu  
145 150 155 160

Pro Gln Arg Pro Ala Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu Arg  
165 170 175

Gln Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val  
180 185 190

50 Gly

55 <210> 8  
<211> 220  
<212> PRT  
<213> Pseudomonas putida

60 <400> 8

Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln Gly Phe Gly Lys Val  
1 5 10 15

5 Pro His Arg Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp  
20 25 30

10 Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Val Asp His Leu  
35 40 45

15 Asn Lys Phe Ser Val Asp Glu Ile Arg His Ala Val Glu Arg Ile Asp  
50 55 60

20 Val Arg Gln His Val Gly Thr Glu Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala  
65 70 75 80

25 Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu  
85 90 95

30 Asp Glu Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala  
100 105 110

35 Gln Gly Arg Ala Ala Ile Ile Gly Arg Ala Pro Phe Glu Val Gly Asp  
115 120 125

40 Arg Val Ile Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Val Arg Met Pro  
130 135 140

45 Ala Tyr Val Arg Gly Lys Gln Gly Val Val Leu His Arg Thr Thr Glu  
145 150 155 160

50 Gln Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Asp Gln Ser Ala Ala  
165 170 175

55 His Gln Pro Thr Tyr His Val Glu Phe Arg Val Arg Asp Leu Trp Gly  
180 185 190

60 Asp Ala Ala Asp Asp Gly Leu Val Val Asp Leu Phe Glu Ser Tyr  
195 200 205

Leu Asp Arg Val Glu Ser Pro Arg Val Val Arg Ala  
210 215 220

55 <210> 9  
<211> 1089  
<212> DNA  
60 <213> *Pseudomonas putida*

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1089)
<223> Gen der Kodierregion des Aktivatorproteins

5 <400> 9
atg agt gcc ggc gca cag gca ggc cgg ctg ccg gtg acg gtc ctt tca
Met Ser Ala Gly Ala Gln Ala Gly Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser
1 5 10 15
10 ggc ttc ctc ggc gca ggc aag acc acc ctg ctc aac cac atc ctg cgc
Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg
20 25 30
15 aac cgc cag ggc ctg aag gtg gcg gtt atc gtc aat gac atg agc gag
Asn Arg Gln Gly Leu Lys Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu
35 40 45
20 gtc aac atc gat gcc gcc cag gtc cag cgc gac gtt gcg ctg tat cgt
Val Asn Ile Asp Ala Ala Gln Val Gln Arg Asp Val Ala Leu Tyr Arg
50 55 60
25 ggc cag gat gaa ttg ata gag atg agc aac ggc tgt atc tgc tgc acc
Gly Gln Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr
65 70 75 80
30 ctg cgc gcc gac ctg ctt gag cag atc agc gcg ctg gcg cgc cag cag
Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Ala Leu Ala Arg Gln Gln
85 90 95
35 cgt ttc gat tac ctg ttg atc gag tcc acc ggg att tcc gag cgc atg
Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met
100 105 110
40 cca gtc gcc gag acc ttt gcc ttt ctc gac gcc aac ggt ttc agc ctc
Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asn Gly Phe Ser Leu
115 120 125
45 agc gaa ctg gcg cgg ctg gat acg ctg gtg acg gtg gtc gat gcc agc
Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Ala Ser
130 135 140
50 cag ttc atg gcc atg ctc gac tct ccc gaa acc gtc gcg cgg gcc gac
Gln Phe Met Ala Met Leu Asp Ser Pro Glu Thr Val Ala Arg Ala Asp
145 150 155 160
55 gtc acc acg gat gac agc agg cgc cgg ctg gcc gat ctg ctg atc gag
Val Thr Thr Asp Asp Ser Arg Arg Pro Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu
165 170 175
60 cag gtc gag tat gcc aat gtg att ctg gtc aac aaa cgc gac ctg gtc
Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Arg Asp Leu Val
180 185 190
65 gac gag gcg cag tac cag gcc ctg cag gca gtt ctc gcc ggg ctc aat
Asp Glu Ala Gln Tyr Gln Ala Leu Gln Ala Val Leu Ala Gly Leu Asn
195 200 205
70 cca ggc gca cag atc ctg ccc atg gtg gcc ggc aac gtc gcc ctg tcc
Pro Gly Ala Gln Ile Leu Pro Met Val Ala Gly Asn Val Ala Leu Ser
210 215 220

```

	agc gtc ctt ggt acc cag ctg ttc gat ttg ccc agc ctt gcc gca gcg	720
	Ser Val Leu Gly Thr Gln Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ala	
	225 230 235 240	
5	ccc ggc tgg atg aaa cag atg gac gcg cac gac acc ccg gcc ggc gag	768
	Pro Gly Trp Met Lys Gln Met Asp Ala His Asp Thr Pro Ala Gly Glu	
	245 250 255	
10	tcg cag acc tat ggc gtg acg tca tgg gtg tac cga gcg cgc gcc ccg	816
	Ser Gln Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Ala Arg Ala Pro	
	260 265 270	
15	ttc cat ccg caa cgc ttg ctt gat ttt ctc gcc cgg ccc tgg cgc gac	864
	Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Ala Arg Pro Trp Arg Asp	
	275 280 285	
20	ggc cgt ctt ctg cgc agc aaa ggt tat ttc tgg ctt gcc agc cgc cac	912
	Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His	
	290 295 300	
25	cgc gaa atc ggc ttg ctg gta cac agc ggc cag cag ttt caa tgg gac	960
	Arg Glu Ile Gly Leu Leu Val His Ser Gly Gln Gln Phe Gln Trp Asp	
	305 310 315 320	
30	tat gtt ggc cat tgg tgg aac ttc atc gac acg tca cag tgg cca cag	1008
	Tyr Val Gly His Trp Trp Asn Phe Ile Asp Thr Ser Gln Trp Pro Gln	
	325 330 335	
35	gac aag tat cgc ttg cag ggc atc atg gcc aag tgg gac agc atc gtc	1056
	Asp Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Met Ala Lys Trp Asp Ser Ile Val	
	340 345 350	
40	gac gac tgc cga cag gag ctg aaa agc tta tga	1089
	Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Lys Ser Leu	
	355 360	
	<210> 10	
	<211> 362	
	<212> PRT	
	<213> Pseudomonas putida	
	<400> 10	
45	Met Ser Ala Gly Ala Gln Ala Gly Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser	
	1 5 10 15	
50	Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg	
	20 25 30	
55	Asn Arg Gln Gly Leu Lys Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu	
	35 40 45	
60	Val Asn Ile Asp Ala Ala Gln Val Gln Arg Asp Val Ala Leu Tyr Arg	
	50 55 60	
	Gly Gln Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr	
	65 70 75 80	

Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Ala Leu Ala Arg Gln Gln  
85 90 95

5 Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met  
100 105 110

10 Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asn Gly Phe Ser Leu  
115 120 125

15 Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Ala Ser  
130 135 140

20 Gln Phe Met Ala Met Leu Asp Ser Pro Glu Thr Val Ala Arg Ala Asp  
145 150 155 160

25 Val Thr Thr Asp Asp Ser Arg Arg Pro Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu  
165 170 175

30 Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Arg Asp Leu Val  
180 185 190

35 Asp Glu Ala Gln Tyr Gln Ala Leu Gln Ala Val Leu Ala Gly Leu Asn  
195 200 205

40 Pro Gly Ala Gln Ile Leu Pro Met Val Ala Gly Asn Val Ala Leu Ser  
210 215 220

45 Ser Val Leu Gly Thr Gln Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ala  
225 230 235 240

50 Pro Gly Trp Met Lys Gln Met Asp Ala His Asp Thr Pro Ala Gly Glu  
245 250 255

55 Ser Gln Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Ala Arg Ala Pro  
260 265 270

60 Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Ala Arg Pro Trp Arg Asp  
275 280 285

Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His  
290 295 300

Arg Glu Ile Gly Leu Leu Val His Ser Gly Gln Gln Phe Gln Trp Asp  
305 310 315 320

Tyr Val Gly His Trp Trp Asn Phe Ile Asp Thr Ser Gln Trp Pro Gln  
325 330 335

Asp Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Met Ala Lys Trp Asp Ser Ile Val  
340 345 350

5 Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Lys Ser Leu  
355 360

10 <210> 11  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

15 <220>  
<223> Primer 1F

<400> 11  
ctccaccata tgagtacagc tacttcaacg

30

20 <210> 12  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

25 <220>  
<223> Primer 1R

<400> 12  
cttcataagg ttcttatctcg gatcaaatgg

30

35 <210> 13  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

40 <220>  
<223> Primer 2F

<400> 13  
atgacggcaa cttcaacccc tggtg

25

45 <210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

50 <220>  
<223> Primer 2R

<400> 14  
tcagctcctg tcggcagtgc

20